



HAL
open science

Etude fonctionnelle des glycoprotéines d'enveloppe du réservoir VIH-1

Anne Huard de Verneuil

► **To cite this version:**

Anne Huard de Verneuil. Etude fonctionnelle des glycoprotéines d'enveloppe du réservoir VIH-1. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT: 2018USPCC260. tel-02992163

HAL Id: tel-02992163

<https://theses.hal.science/tel-02992163>

Submitted on 6 Nov 2020

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.

Ecole doctorale BioSPC

Département Infectiologie, Microbiologie DTSMIB

Unité INSERM 941

Etude fonctionnelle des glycoprotéines d'enveloppe du réservoir VIH-1

Par Anne de Verneuil

Thèse de doctorat de microbiologie

Dirigée par François Clavel

Présentée et soutenue publiquement à l'IUH, le 30 mars 2018

Président du jury : Ceccaldi, Pierre-Emmanuel, Pr, Paris Diderot, Pasteur
Rapporteurs : Barin, Francis, Pr, Université de Tours, INSERM
Etienne, Lucie, Dr, Université de Lyon, CNRS
Examineurs : Lelièvre, Jean-Daniel, Pr, Université de Créteil, INSERM
Berlioz-Torrent, Clarisse, Dr, Université Paris Diderot, INSERM
Directeur de thèse : Clavel, François, Pr, Université Paris Diderot, INSERM
Membre invité : Dutrieux Jacques, Dr, Université Paris Diderot, INSERM



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Résumé

Etude fonctionnelle des glycoprotéines d'enveloppe du réservoir VIH.

Le réservoir VIH-1 des lymphocytes T CD4⁺ quiescents présente seulement une faible proportion de génomes intacts. La fonctionnalité des protéines virales codées par ces séquences n'a pas encore été complètement élucidée. Lors de cette étude, je me suis concentrée sur l'expression et la fonctionnalité de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH, qui est une cible majeure du système immunitaire et un important agent pathogène. Les lymphocytes T CD4⁺ quiescents ont été isolés à partir de prélèvements sanguins de patients sous traitement antirétroviral dont la charge virale était contrôlée depuis plus de 4 ans. Les séquences du gène *env* ont été obtenues à partir de deux sources : soit les cellules ont été stimulées et cultivées en condition de dilution limite avec des cellules cibles pour permettre la propagation de virus clonaux en culture (VOA), soit les ARN viraux produits par les cellules après stimulation ont été extraits et amplifiés par RT-PCR. Les gènes *env* ont été clonés dans un plasmide d'expression et séquencés. L'expression des protéines a été quantifiée par Western Blot, cytométrie, et immunofluorescence. La fonctionnalité des glycoprotéines d'enveloppe a été mesurée par un test de fusion cellule-cellule et un test d'infectivité de pseudo-particules virales. Toutes les séquences *env* issues des VOA sont intacts alors que 26% de celles dérivées des ARNm des LT CD4⁺ quiescents présentent des mutations. Plus le patient est traité précocement, plus la diversité virale de son réservoir est restreinte. Pour les tests de fusion et d'infectivité, seules les séquences intactes ont été testées. Les enveloppes du réservoir VIH-1 ne sont pas toutes fonctionnelles : une grande proportion des Envs dérivées des ARNm (27.5%) sont peu fonctionnelles par rapport au contrôle positif (< 25%) et 14% ne présentent aucune activité fusogénique détectable. Les enveloppes des virus de VOA sont plus fusogéniques que celles dérivées des ARNm : 90% des enveloppes des virus de VOA sont au dessus de 50% de la fonctionnalité du contrôle positif contre seulement 41% pour les enveloppes dérivées des ARNm. L'étude des glycoprotéines d'enveloppe par Western Blot et par cytométrie a permis d'établir respectivement une corrélation entre leur niveau d'expression et leur fonctionnalité ainsi qu'entre le nombre de cellules les exprimant à leur surface et leur fonctionnalité. Les défauts de fusogénicité et d'infectivité des Env du réservoir sont essentiellement dus à un problème d'expression, de maturation, de stabilité et/ou d'adressage à la surface cellulaire. Ces défauts pourraient contribuer à l'accumulation de séquences apparemment intactes mais défectueuses au sein du réservoir VIH-1. En outre, ces glycoprotéines d'enveloppe pourraient échapper à l'immunité lors des stratégies de « kick and Kill ».

Mots clés : VIH, Réservoir, LT CD4⁺ quiescent, enveloppe

Genetically intact but functionally impaired HIV-1 Env glycoproteins in the T-cell reservoir.

HIV-infected subjects under ART harbor a persistent viral reservoir in resting CD4⁺ T-cells, which accounts for the resurgence of HIV-1 replication after ART interruption. A large majority of HIV reservoir genomes are genetically defective, but even among intact proviruses, few seem able to generate infectious virus. To understand this phenomenon, we have examined the function and expression of HIV envelope glycoproteins reactivated from the reservoir of HIV-infected subjects under suppressive ART. We studied full-length genetically intact *env* sequences from both replicative viruses and cell-associated mRNAs. We found that these Env proteins varied extensively in fusogenicity and infectivity, with strongest functional defects found in Envs from cell-associated mRNAs. Env functional impairments were essentially explained by defects in Env protein expression. Our results support the idea that defects in HIV Env expression, preventing cytopathic or immune HIV clearance, contribute to the persistence of the HIV T-cell reservoir *in vivo*. In most individuals, evolution of HIV infection is efficiently controlled on the long-term by combination antiviral therapies. These treatments, however, fail to eradicate HIV from the infected subjects, a failure that results both in resurgence of virus replication and in resumption of HIV pathogenicity when the treatment is stopped. HIV resurgence, in these instances, is widely assumed to emerge from a reservoir of silent virus integrated in the genome of a small number of T lymphocytes. The silent HIV reservoir is mostly composed of heavily deleted or mutated HIV DNA. Moreover, among the seemingly intact remaining HIV, only very few are actually able to efficiently propagate in tissue culture. In this study, we find that intact HIV in the reservoir often carry strong defects in their capacity to promote fusion to neighboring cells and infection of target cells, a defect related to the function and expression of the HIV envelope glycoprotein. Impaired envelope glycoprotein expression and function could explain why cells harboring these viruses tend to remain undetected and unharmed in the reservoir.

Keywords : HIV, Reservoir, resting CD4⁺ T cells, envelope

« Prends conseil auprès de l'ignorant comme du savant. »
Proverbe de Ptahhotep ; Sagesse égyptienne - III^e millénaire av. J.-C.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs de ma thèse, le Pr Francis Barin et le Dr Lucie Etienne d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit et tous les membres de mon Jury pour le temps qu'ils ont accordé à l'étude de mon sujet de doctorat.

Je remercie tous les individus ayant accepté d'être prélevés pour faire avancer la recherche et je remercie l'ANRS d'avoir financé ce projet.

Je tiens à remercier profondément mon directeur de thèse, François Clavel, pour m'avoir proposé un sujet qui m'a tout de suite passionné. Sans cette opportunité, je n'aurais jamais pu développer mes capacités scientifiques dans un cadre aussi porteur. François, tu as su m'encadrer tout en m'encourageant à devenir de plus en plus indépendante dans mes projets, mes recherches et mes analyses. Ta porte était toujours ouverte quand j'en avais besoin pour des conseils ou quand je doutais.

Je tiens tout particulièrement à remercier ma chère collègue et amie Julie Migraine. Ma joie tous les matins de te retrouver pour partager nos succès comme nos erreurs du quotidien m'a permis de toujours rester motivée pour persévérer dans mes recherches. Les longues heures à nos paillasses voisines m'ont paru si courtes. Partager le bureau avec toi pendant ces trois ans était un vrai bonheur autant quand nous étions bruyantes que quand nous étions silencieuses et sérieuses. Tu m'as beaucoup appris depuis le début de mon stage de M2, surtout au P3 où l'environnement m'était étranger. Je te remercie énormément pour ton aide précieuse notamment pour les manips d'infection de pseudo-particules qui étaient fastidieuses.

Je tiens à remercier très sincèrement Jacques Dutrieux. Cher Jacques, ton arrivée au laboratoire a apporté un souffle nouveau dans mon travail. Par ton savoir-faire et ta culture scientifique, tu m'as permis d'approfondir mon sujet avec de nouvelles techniques. Tu as pris du temps pour m'assister et me reconforter face aux premiers résultats pas toujours positifs. Je ne te remercierai jamais assez pour les relectures méticuleuses de mon manuscrit. Et j'espère qu'on continuera à travailler ensemble ou à partir lors de congrès dans la pampa !!

Je remercie Fabrizio Mammano pour son écoute et ses conseils aussi bien pour les expérimentations que pour les analyses statistiques. Je remercie Nathalie Ahrel pour son accueil chaleureux lors de mes premiers pas dans l'Unité et Béatrice Labrosse pour son enseignement et son soutien lors de mon stage de master.

Je remercie également Anthony Machado car il m'a montré la marche à suivre. Tes présentations étaient toujours parfaites, ton organisation rigoureuse, tu posais toujours les bonnes questions. Ta bonne humeur me donnait toujours le sourire et même si je râlais, j'étais contente que tu viennes nous déranger pour papoter dans notre bureau avec Julie.

Je remercie Linda Feghoul pour sa patience et sa douceur, notre bureau avec Julie est devenu un havre de paix en ta présence.

Je remercie aussi Juliette Fernandez et Deborah Portillo pour m'avoir appris des techniques de biologie moléculaire avec une grande pédagogie. Je vous remercie encore de m'avoir encouragé tout au long de mon doctorat. J'ai pleuré vos départs respectifs comme vous avez pu le remarquer.

Je remercie Azaria Rémion pour m'avoir toujours incité à porter un regard critique sur les postulats déjà établis et je remercie Ana Santos d'avoir pris le temps de s'occuper de moi au P3 à mes débuts.

Je remercie enfin mes deux stagiaires, Rachid et Alexis pour toutes les minipreps qu'ils ont dû effectuées et qui m'ont été très utiles.

Je remercie mon entourage proche pour son soutien quotidien.

Table des matières

Résumé	2
Remerciements.....	4
Table des matières.....	6
Liste des abréviations	9
Liste des illustrations	12
Introduction	14
I. Le virus de l'immunodéficience humaine.....	15
I.A. Découverte du VIH.....	15
I.B. Physiopathologie du VIH	15
I.C. Réplication du VIH	17
I.D. Traitements passés et actuels	18
I.E. Obstacles à l'éradication	20
II. Le réservoir VIH-1	21
II.A. Le rebond virémique, conséquence d'un réservoir viral.....	21
II.B. Cellules impliquées dans le réservoir VIH-1	23
II.B.1. Les monocytes, macrophages et cellules dendritiques	23
II.B.2. Les Lymphocytes T CD4 ⁺	24
II.C. Mise en place et maintien de la latence.....	27
II.C.1. Intégration et expression du génome viral.....	27
II.C.2. Protéines virales impliquées dans la latence.....	29
II.C.3. Les facteurs cellulaires de la latence	31
II.D. Constitution génétique et quantification du réservoir VIH-1.....	32
II.D.1. Quantification des provirus latents.....	32
II.D.2. Composition génétique du réservoir VIH-1	33
II.D.3. Quantification du réservoir VIH-1 fonctionnel	35
II.D.3.1. Quantification des ARNv associés aux cellules réactivées.....	35
II.D.3.2. Quantification des virus émergeant du réservoir VIH-1	36
II.D.4. Expansion clonale des cellules du réservoir VIH-1.	37
II.E. Vers une rémission fonctionnelle ou une guérison.....	39
II.E.1. Réversion de la latence et élimination du réservoir VIH-1	40
II.E.2. Agents de réversion de la latence	41

II.F.	Induction de l'immunité cellulaire et humorale.....	44
II.F.1.	Contrôle du réservoir VIH-1 et inhibition de son expression	46
II.F.2.	Eradication du virus par thérapie génique.....	48
III.	Glycoprotéine d'enveloppe.....	49
III.A.	Gène de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1.....	49
III.B.	Expression et Maturation	49
III.C.	Structure et domaines.....	52
III.C.1.	La glycoprotéine 120.....	52
III.C.2.	La glycoprotéine 41.....	52
III.D.	Interaction avec CD4 et CCR5/CXCR4 et fusion.....	54
III.E.	L'enveloppe, un agent pathogène.....	56
Objectifs.....		60
Matériels & Méthodes.....		63
I. Recrutement des individus de l'étude.....		64
II. Cultures cellulaires.....		64
II.A.	Les lignées cellulaires	64
II.B.	Les cellules primaires.....	65
III. « Viral outgrowth assay » quantitatif (qVOA).....		65
IV. Quantification de l'ADN viral total du réservoir VIH-1.....		66
V. Amplification des env.....		66
V.A.	A partir des virus émergeant des VOA	66
V.A.1.	Extraction d'ADN	66
V.A.2.	PCR	67
V.B.	A partir des ARNm transcrits par les LT CD4 ⁺ quiescents réactivés.....	67
V.B.1.	Extraction d'ARN et rétro-transcription	67
V.B.2.	PCR en dilution limite	68
VI. Clonage des env.....		68
VII. Séquençage des env.....		69
VIII. Fonctionnalité des Env.....		69
VIII.A.	Test de fusion cellule-cellule	69
VIII.B.	Test d'infectivité.....	69
IX. Expression des Env.....		70
IX.A.	Western Blot (Immuno-buvardage)	70
IX.B.	Cytométrie en flux.....	71

IX.C.	Immunofluorescence.....	71
X.	Analyse phylogénétique	72
XI.	Analyses statistiques	72
Résultats	73
I.	Quantification des virus émergeant du réservoir VIH-1 après réactivation.....	74
I.	Analyse phylogénétique des sequences <i>env</i>	75
II.	Fonctionnalité des enveloppes du réservoir VIH-1	77
II.A.	Fusogénicité des enveloppes du réservoir VIH-1	77
II.B.	Infectivité des pseudo-particules virales portant les Env du réservoir VIH-1	81
III.	Expression des enveloppes du réservoir VIH-1.....	82
III.A.	Expression totale	82
III.B.	Expression au niveau de la membrane plasmique	84
III.B.1.	Nombre de cellules exprimant les enveloppes à la surface.....	84
III.B.2.	Quantité d'enveloppes à la surface des cellules.....	86
Discussion & Perspectives	88
I.	Discussion	89
II.	Perspectives	95
Conclusion	100
Références bibliographiques	102
Annexes.....	139

Liste des abréviations

ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AP : Adapline
ARN : Acide Ribonucléique
ARN_i : Acide Ribonucléique interférent
ARN_{sg} : Acide Ribonucléique single guide
bNAbs : broadly Neutralising Antibody's
CARD-SGS : Cell Associated RNA and DNA Single Genome Sequencing
cART : Combinated Antiretroviral therapy
CCR5 : C-C Chemokine Recepteur type 5
CD : Cellule Dendritique
CD4 : Cluster de Différenciation 4
CDF : Cellule Dendritique Folliculaire
CG : Centre Germinatif
CNS : central nervous system
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTL : Cytotoxic T lymphocytes
CXCR4 : C-X-C Chemokine Recepteur type 4
DC : Domaine Cytoplasmique
dPCR : digital PCR
ddpcr : digital droplet PCR
EC : Extra-Cellulaire
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCD : follicular
gp : glycoprotéine
HAART : High Active Antiretroviral Therapy
HDAC : Histone Désacétylase
HDAC_i : Histone Désacétylase inhibitor
HLA : Human Leukocyte Antigen

HMT_i : Histone Methyl-Transferase inhibitor
HR : Heptameric Region
iCARED : inducible Cell-Associated RNA Expression in Dilution
IL : Interleukines
IFN_α : Interferon
INDEL : Insertion or Deletion of bases
INNTI : Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse
INTI : Inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse
IP : Inhibiteur de Protéase
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LRA : latency reversing agent
LT : Lymphocyte Thymus
LTR : Long Terminal Repeat
MSD : Major Spliced Donor
PACC : Pro-Apoptotic Chromatin Condensation
PBMC : Peripheric Blood Monuclear Cells
PCR : Polymerase Chain Reaction
PKC : Protein Kinase C
PTC : Post Traitment Controller
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
qVOA : quantitative Viral Outgrowth Assay
RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux
RT : RetroTranscription
RT-PCR : RetroTranscripton –Polymerase Chain Reaction
SB : Southern Blot
SCA : Single Copy Assay
SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
TAT : Trans-Activator of Transcription
TAR : Trans-Activation Response element
T_{CM} : Thymus centrale memoire
TCS : Transplantation de Cellules Souches
T_{EM} : Thymus effector memoire

T_{fh} : Thymus follicular helper

TILDA : Tat/rev Induced Limiting Dilution Assay

TM : Trans-Membranaire

T_{reg} : Thymus regulator

T_{SCM} : Thymus souche centrale memoire

TZA : TZM-bl cell based Assay

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VOA : Viral Outgrowth Assay

WB : Western Blot

Liste des illustrations

Figure 1. Schéma simplifié de la physiopathologie du VIH-1 chez un individu infecté non traité.....	16
Figure 2. Cycle de réplication simplifié du virus de l'immunodéficience humaine (adapté du NIH).	17
Figure 3. Epidémiologie 2016 d'après ONUSIDA	20
Figure 4. Résumé des délais du rebond viral. (d'après Deeks et al., 2016a).....	23
Figure 5. Similarité entre les génomes des virus du rebond et les provirus intégrés dans les LT CD4⁺ quiescents (d'après Kearney et al., 2015).	26
Figure 6. Génome du VIH-1.	28
Figure 7. Composition du réservoir VIH-1 (d'après Bruner et al., 2016).	34
Figure 8. Quantification du réservoir viral total, intact et fonctionnel (d'après Ho et al., 2013).....	36
Figure 9. Résumé des méthodes de quantification du réservoir VIH (d'après Deeks, et al., 2016a).....	38
Figure 10. Schéma résumant les mécanismes d'action des LRA (d'après Shang et al., 2015).	43
Figure 11. Anticorps neutralisant la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 (d'après Mouquet, 2014).	45
Figure 12. Gène de l'enveloppe du VIH-1 (d'après Los Alamos HIV LAB).....	49
Figure 13. Structure du trimère de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 (d'après Lyumkis et al., 2013).	50
Figure 14. Adressage antérograde et rétrograde des protéines d'enveloppe (Env) et des protéines Gag du VIH-1 dans la cellule infectée (d'après Murakami, 2008).	51
Figure 15. Domaines et motifs des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 (d'après Steckbeck et al., 2013).	53
Figure 16. Entrée du VIH (Starr-Spires and Collman, 2002).	55
Figure 17. Mécanismes de pathogénèse causés par la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 (d'après Perfettini et al., 2005).	57
Figure 18. Mécanismes de l'enveloppe du VIH-1 induisant l'apoptose (d'après Mbita et al., 2014).....	59

Figure 19. Schéma du protocole effectué pour obtenir les séquences des glycoprotéines d'enveloppes des virus émergeant des VOA et celle des ARN associés aux LT CD4⁺ quiescents du réservoir VIH-1, réactivées.	66
Figure 20. Schéma expliquant les étapes effectuées pour la quantification des glycoprotéines d'enveloppes présentes à la surface des cellules.....	72
Figure 21. Quantification et comparaison des réservoirs VIH-1 totaux et fonctionnels.	74
Figure 22. Etude des virus émergeant des VOA.	75
Figure 23. Analyse phylogénétique des séquences <i>env</i> dérivées des ARNm et des qVOA. .	77
Figure 24. Analyse fonctionnelle de la fusogénicité des enveloppes du réservoir intra-individu.	78
Figure 25. Analyse fonctionnelle de la fusogénicité des enveloppes du réservoir VIH-1 inter-individu.	79
Figure 26. Comparaison de la fusogénicité des Env dérivées des ARNm et des qVOA.	80
Figure 27. Phylogénie et capacité de fusion des enveloppes du réservoir VIH-1.	81
Figure 28. Comparaison du test de fusion cellule-cellule avec le test d'infectivité de pseudo-particules.....	82
Figure 29. Expression des enveloppes du réservoir VIH-1.	83
Figure 30. Défauts d'expression des enveloppes du réservoir VIH-1 et conséquences sur leur fonctionnalité.	84
Figure 31. Expression membranaire des enveloppes du réservoir VIH-1.	85
Figure 32. Expression des enveloppes du réservoir VIH-1 à la surface des cellules.	86
Figure 33. Défaut d'expression extracellulaire des enveloppes du réservoir VIH-1.....	87
Figure 34. Schéma du rôle potentiel des enveloppes fonctionnelles versus enveloppes peu exprimées ou peu fonctionnelles du réservoir VIH-1 sur l'infection sous cART.....	91
Figure 35. Quantification du réservoir VIH-1 fonctionnel parmi le réservoir VIH-1 "intact".	92
Tableau 1. Description de l'historique VIH des individus et des qVOA clonaux.	64
Tableau 2. Conditions de PCR	67

Introduction

I. Le virus de l'immunodéficience humaine

I.A. Découverte du VIH

Le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) a été signalé pour la première fois en 1981 par le CDC (*Centers for Disease Control*) aux USA sous la forme de l'émergence de multiples cas d'un déficit immunitaire mortel, affectant essentiellement des hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (HSH). La signature de ce déficit immunitaire était l'effondrement constant, chez les personnes touchées, du nombre des lymphocytes T CD4⁺. Cette maladie s'est rapidement propagée à d'autres continents, touchant alors d'autres individus que les HSH. En effet, de nombreux cas de SIDA sont apparus en Europe, en Afrique puis en Amérique du Sud et en Asie dans les années 80. Deux modes de transmission de cette affection sont alors identifiés : par rapports sexuels et par exposition à du sang ou des produits dérivés du sang. Ces observations ont permis d'établir que le SIDA était une maladie transmissible due à un virus. C'est ainsi que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'agent étiologique du SIDA a été identifié et isolé deux ans plus tard en 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983) : il s'agit d'un *Retroviridae* du genre *Lentivirus* dont la cible préférentielle est constituée par les lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4⁺).

I.B. Physiopathologie du VIH

La primo-infection par le VIH se caractérise par un syndrome viral aigu non spécifique (fièvre, pharyngite, éruption cutanée, adénopathies, etc.) au cours duquel le VIH se réplique de façon très intensive dans tous les tissus lymphoïdes de l'organisme (Kahn and Walker, 1998). La virémie varie alors entre 100 et 10 000 doses infectieuses par million de cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC), soit près de 10⁶ à 10⁸ copies d'ARNv/ml (Daar et al., 1991) durant les premières semaines d'infection. Au cours des semaines qui suivent la primo-infection, le système immunitaire de l'hôte, qui est encore pleinement fonctionnel, permet une diminution de la virémie grâce à la production d'anticorps neutralisants et à l'action des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (Koup et al., 1994, cf. **Figure 1**). Ce contrôle immunitaire conduit à une stabilisation de la charge virale jusqu'à un plateau nommé « *set point* » dont la valeur est variable selon les individus (10⁴ copies d'ARNv/ml en

moyenne)(Fraser et al., 2007; Mellors et al., 1996). Cette période de relative stabilité, aussi nommée phase chronique, est également de durée variable. Toutefois, chez la très large majorité des sujets infectés par le VIH, en moins de dix ans, l'échappement du virus au système immunitaire induit l'augmentation progressive de la charge virale et une très forte diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺ (Albert et al., 1990; Douek et al., 2003, cf **Figure 1**). Cette déplétion des LT CD4⁺ s'accompagne du passage de la phase asymptomatique à une phase caractérisée par des infections opportunistes : maladie de Kaposi (une lésion cutanée proliférative liée au virus HHV8), pneumonie à *Pneumocystis carinii*, parasitoses et mycoses digestives, tuberculose, infections systémiques par d'autres mycobactéries, méningites à cryptocoques, infection généralisée par le cytomégalovirus, encéphalites virales, lymphomes et autres cancers (Grossman et al., 2002; McCune, 2001; Rowland-Jones, 1999). En absence de traitements antirétroviraux au cours des années 80 et jusqu'en 1995, l'infection par le VIH est presque toujours mortelle à terme.

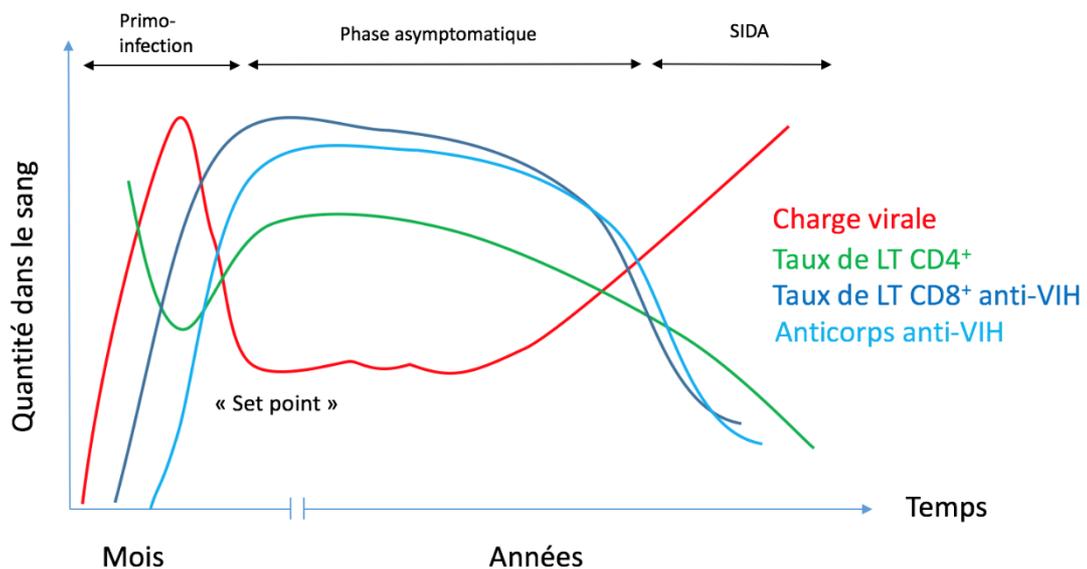


Figure 1. Schéma simplifié de la physiopathologie du VIH-1 chez un individu infecté non traité.

La charge virale est mesurée en \log_{10} de copies d'ARN VIH/ml de plasma, et les taux de LT en nombre de cellules/ mm^3 de plasma. Les anticorps sont quantifiés par un test ELISA.

I.C. Réplication du VIH

La particule virale est une sphère de 90 à 145nm de diamètre selon son état de maturité (Briggs et al., 2003). Son enveloppe est une bicouche lipidique provenant de la cellule infectée depuis laquelle elle a bourgeonné (cf. **Figure 2**). Au sein de cette bicouche lipidique, sont insérés en moyenne 14 glycoprotéines d'enveloppe trimériques d'origine virale (gp160) comprenant une région globulaire en surface (gp120) liée de manière non covalente à une région transmembranaire (gp41) (Zhu et al., 2006). A l'intérieur de cette enveloppe, la protéine de matrice (p17) contient elle même la capsid (p24) qui une fois mature est sous forme trapézoïdale. Dans chaque capsid, deux copies d'ARN viral simple brin sont associées à la nucléocapsid (p7), à la protéase virale (p14), à l'intégrase (p31) ainsi qu'à la transcriptase inverse (RT pour *Reverse Transcriptase*, p66/51). En outre, des protéines cellulaires sont aussi retrouvées au sein des particules virales comme certains facteurs de restriction cellulaires.

Ces particules virales infectent différents types cellulaires du système immunitaire. Sa principale cible sont les lymphocytes T CD4⁺ mais ce virus se réplique également dans les macrophages et les cellules dendritiques.

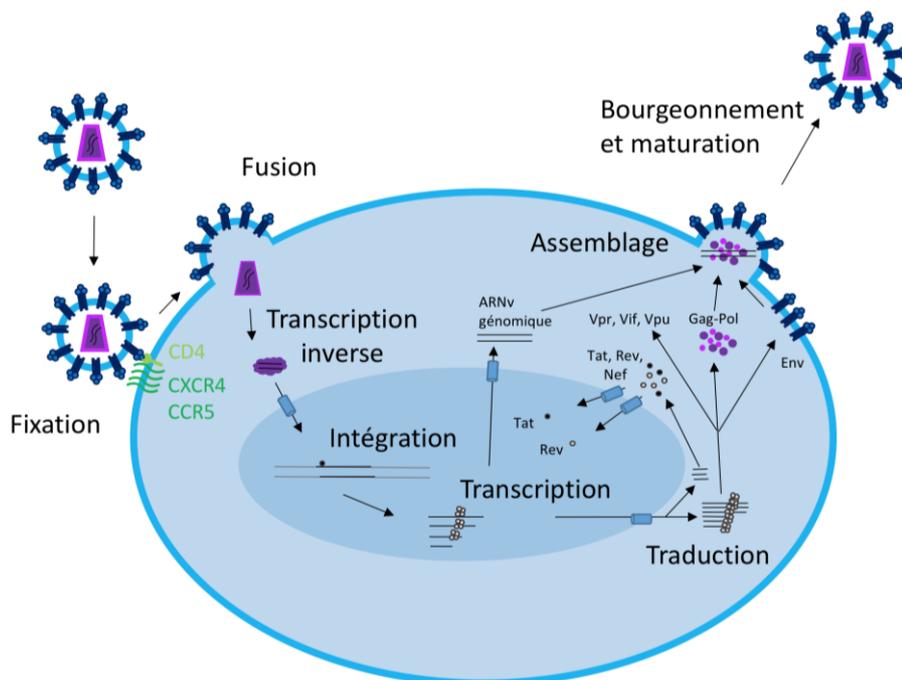


Figure 2. Cycle de réplication simplifié du virus de l'immunodéficience humaine.

Le cycle de réplication se divise en étapes précoces et tardives. La fixation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 permet une fusion entre la membrane plasmique de la cellule et l'enveloppe virale. Puis la capsid est libérée dans le cytoplasme et les ARN viraux sont rétro-transcrits en ADN. L'ADN viral est importé dans le noyau où il est intégré au génome de la cellule hôte puis exprimé par la machinerie cellulaire. Les protéines virales une fois synthétisées s'assemblent avec l'ARN génomique viral au niveau de la membrane plasmique. Les virus après bourgeonnement subissent une maturation par la protéase virale qui leur permet d'être infectieux.

Le VIH se lie à son récepteur CD4 et à son corécepteur CXCR4 ou CCR5 par l'intermédiaire de la gp160 (cf. **Figure 2**). Cette liaison entraîne la formation d'un pore entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale permettant la libération de la capsid virale dans le cytoplasme où elle est partiellement dégradée. La transcription inverse de l'ARN viral s'opère alors grâce aux protéines qui lui sont associées, en particulier la transcriptase inverse virale et grâce aux dntp de la cellule infectée (cf. **Figure 2**). L'ADN viral double brin obtenu est associé à l'intégrase, à la transcriptase inverse, à la protéine virale r (Vpr) et la protéine de matrice formant un complexe dit de pré-intégration. Ce dernier est importé dans le noyau grâce aux signaux de localisation nucléaire de certaines des protéines virales du complexe (Sherman *et al.* 2002). L'intégration du génome viral linéaire dans le génome cellulaire (provirus) est ensuite catalysée par l'enzyme virale nommée intégrase. La transcription du provirus par la polymérase II cellulaire est ensuite permise grâce au promoteur situé dans le LTR 5'. Puis la machinerie cellulaire permet la traduction des protéines de régulation Tat (« *Transactivator* »), Rev (« *Regulatory of viral expression* ») et Nef (« *Negative regulatory factor* »), des protéines de structures (Gag), des enzymes virales (Pol) et des glycoprotéines d'enveloppe (Env) ainsi que des protéines accessoires Vif (« *Virion infectivity factor* »), Vpr (« *Viral protein r* »), et Vpu (« *Viral protein unknown* »). Les protéines Gag-Pol et Vpr vont ensuite s'assembler au niveau de la membrane plasmique (cf. **Figure 2**). La protéine de matrice va permettre l'encapsidation des deux copies d'ARN du génome viral ainsi que le bourgeonnement de la particule virale depuis la surface de la cellule. Pour que la particule virale arrive à maturité, la protéase virale clive les protéines Gag et Pol. Le virion néo-synthétisé est alors prêt pour infecter une nouvelle cellule cible.

I.D. Traitements passés et actuels

Les premiers antiviraux utilisés contre le VIH étaient des analogues nucléosidiques (Fischl *et al.*, 1987). Ces molécules reproduisent la structure d'un nucléoside mais leur extrémité 3' est modifiée de sorte qu'après leur triphosphorylation et leur incorporation dans l'ADN, il est impossible pour la transcriptase inverse de poursuivre l'élongation de l'ADN : ces molécules agissent sur l'ADN comme terminateurs de chaîne. Utilisés en monothérapie, ces traitements se sont vus rapidement confrontés à une perte rapide de leur efficacité en raison

du développement rapide de mutations de résistance dans le gène codant pour la transcriptase inverse. En bithérapie, ces inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (INTI) ont permis des rémissions prolongées, en particulier avec les associations d'AZT et 3TC ou d4T et ddl. Un an plus tard, l'apparition des inhibiteurs de protéase (IP) et des inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) donne la possibilité de traiter les individus infectés par le VIH avec des associations d'antirétroviraux en trithérapie (Danner et al., 1995; Roberts et al., 1990). L'efficacité de la combinaison de ces antirétroviraux a alors permis pour la première fois d'observer des rémissions prolongées, accompagnées d'un niveau indétectable de virémie, en dessous de 500 copies d'ARNv/ml (Gulick et al., 1997; Hammer et al., 1997). En effet, la résistance à certains des antiviraux utilisés dans ces associations requiert l'apparition synergique de mutations au sein du génome du VIH, ce qui nécessite une réplication prolongée du virus, laquelle n'est pas autorisée par l'action rapide et fortement suppressive des trithérapies. Dans les années qui ont suivi, plusieurs nouvelles classes d'inhibiteurs de la réplication du VIH sont apparues, des inhibiteurs de l'entrée (Chan and Kim, 1998; Reeves and Piefer, 2005; Walker et al., 2005) et surtout des inhibiteurs de l'intégrase, ces derniers étant les plus largement prescrits (Pommier et al., 2005). Au fil des années, des inhibiteurs de plus en plus puissants ont été développés. Ils sont plus résilients aux mutations de résistance et de mieux en mieux tolérés par les individus infectés (Hammer et al., 1996; Thompson et al., 2012). Les personnes infectées par le VIH, et traitées par trithérapie, sont à l'abri des conséquences néfastes de l'infection par le VIH dans les pays disposant de ressources suffisantes pour faire face au coût des traitements ainsi qu'aux suivis médicaux et biologiques de l'infection. De plus, il est apparu que les personnes traitées et dont la virémie est indétectable de façon stable ne transmettent pas le VIH à leurs partenaires sexuels (Jin et al., 2010). Ainsi, l'objectif principal des autorités mondiales de santé est de conduire des campagnes de détection aussi efficaces que possible, de traiter tous les sujets détectés positifs pour le VIH, ce qui, si une proportion suffisante de sujets infectés parvient à être traitée, devrait conduire à une stabilisation, voire une inflexion progressive de la pandémie.

I.E. Obstacles à l'éradication

Le principal obstacle à cet objectif tient à un simple fait : les traitements antirétroviraux doivent être pris à vie et tous les jours, chez tous individus infectés. En effet, chez toute personne infectée par le VIH, l'interruption du traitement pour une période de plus de 3 à 4 semaines conduit invariablement à une résurgence de la virémie, une baisse du nombre de LT CD4⁺ et un risque de transmission du VIH aux partenaires sexuels (Abreu et al., 2014; Wong et al., 1997). En 2016, 1 million sur 36,7 millions de personnes vivant avec le VIH sont décédées (cf **Figure 3**). Seulement 54% des adultes, 76% des femmes enceintes ou allaitantes et 43% des enfants infectés par le VIH reçoivent un traitement antirétroviral à vie car les médicaments restent très coûteux. En outre, 70% seulement des personnes vivant avec le VIH connaîtraient leur sérologie. Ainsi 30 % ne seraient pas traités par cART à cause d'un défaut de dépistage.

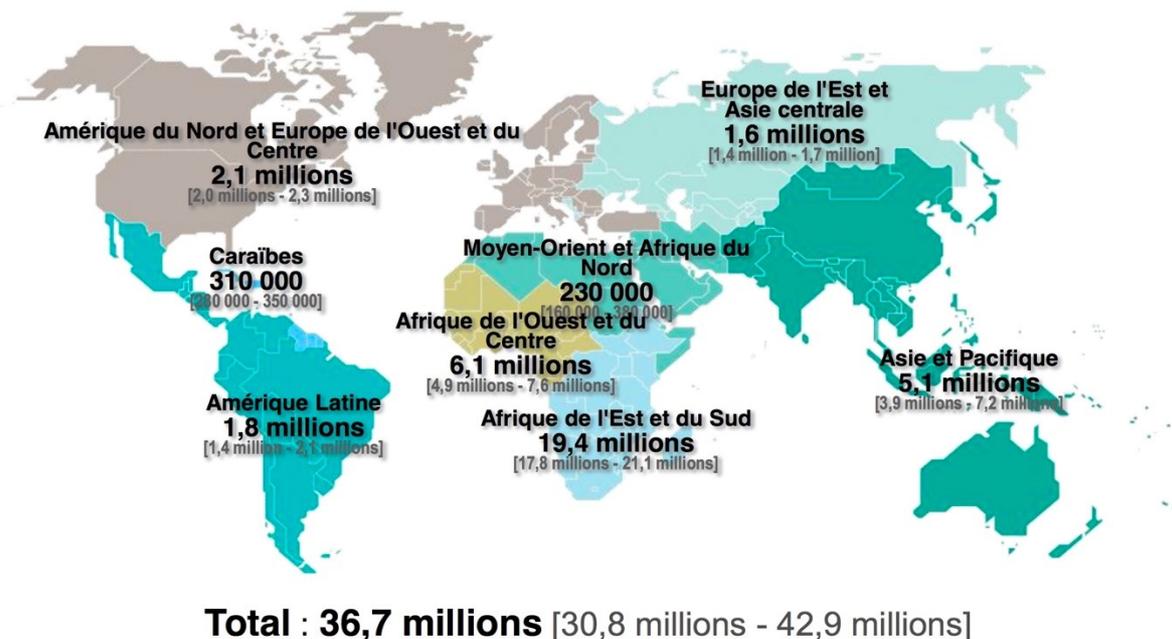


Figure 3. Epidémiologie mondiale du VIH-1 en 2016, d'après ONUSIDA.

Entre 2000 et 2016, le nombre de nouvelles infections a diminué de 39% et 13,1 millions de vies ont été sauvées grâce au traitement antirétroviral. Mais, chez certains individus, les traitements doivent être parfois modifiés à cause des résistances aux antirétroviraux (Aleman et al., 2002; Beyrer and Pozniak, 2017; Clavel and Hance, 2004; Cozzi-Lepri et al., 2007; Kempf et al., 2004). Dans la plupart des cas, un rebond virémique est observé indiquant l'émergence

d'un virus mutant résistant (Davey et al., 1999). En outre, les antirétroviraux provoquent des effets indésirables importants au bout de plusieurs années de traitement. En plus des troubles métaboliques et neurologiques, les patients souffrent de complications rénales et cardiovasculaires (Friis-Møller et al., 2010). Ces obstacles mettent en lumière la nécessité de trouver des nouveaux traitements pour éradiquer le virus ou du moins le contrôler. Or pour cela, il est tout d'abord nécessaire d'étudier la source de ce rebond et ses mécanismes de maintien au sein de l'organisme hôte.

II. Le réservoir VIH-1

II.A. Le rebond virémique, conséquence d'un réservoir viral

Le rebond virémique se produit quelle que soit la période au cours de laquelle la personne a été traitée efficacement. Seuls de très rares cas de remission ont été observés, chez des individus nommés PTC pour « *Post-treatment controller* » (Cockerham et al., 2016; Hocqueloux et al., 2010; Sáez-Cirión et al., 2013, cf. **Figure 4**). Même en traitant dès la phase hyper-aiguë de l'infection et après plusieurs années de virémie indétectable, résultat d'une observance et d'une efficacité parfaite des antirétroviraux, l'arrêt du traitement conduit au retour rapide d'un virus répliatif, pathogène, et transmissible ((Henrich et al., 2017b), cf. **Figure 4**). Ces observations, qui démontrent l'impossibilité de guérir à l'échelle individuelle l'infection par le VIH à l'aide des antiviraux disponibles aujourd'hui, peuvent s'expliquer par deux mécanismes possiblement non exclusifs.

- Certains auteurs ont observé que les rares génomes viraux détectables chez les patients traités font l'objet de fluctuations génétiques au fil du temps (Chaillon et al., 2017). Ces travaux concluent que certaines de ces fluctuations peuvent s'expliquer par une réplication persistante du VIH dans des compartiments tissulaires et cellulaires imperméables aux antirétroviraux. Ces sanctuaires, notamment le système nerveux central (SNC) (Gorantla et al., 2012; Petry and Lüke, 1997; Vigorito et al., 2015) et les gonades (Imaz et al., 2016; Jenabian et al., 2016) pourraient ainsi participer au rebond virémique. Il existe aussi des arguments biologiques en faveur d'une réplication virale persistante sous cART. Certains antirétroviraux comme les IP sont moins efficaces dans les monocytes et les macrophages, n'empêchant pas la réplication virale de subsister sous cART dans ces cellules (Perno et al.,

1998). Etant donné que les antirétroviraux ne peuvent pas pénétrer correctement dans le SNC, les gonades et les centres germinatifs des ganglions lymphatiques, l'infection classique ainsi que celle en *trans* des macrophages et des DC peuvent influencer celles des lymphocytes T CD4⁺ dans ces sanctuaires (Dahl et al., 2014; Embretson et al., 1993; Harezlak et al., 2011, 2014; Imaz et al., 2016; Jenabian et al., 2016; Perreau et al., 2013; Petry and Lüke, 1997; Smith et al., 2001; Valcour et al., 2012; Vigorito et al., 2015). De plus, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques ne peuvent pénétrer en grand nombre dans certains sanctuaires (Imaz et al., 2016; Quigley et al., 2007; Robillard et al., 2014) comme les gonades (Jenabian et al., 2016), et les centres germinatifs (Embretson et al., 1993; Perreau et al., 2013; Smith et al., 2001). Ainsi une réplication résiduelle persisterait sous cART et le réservoir VIH-1 des lymphocytes T CD4⁺ continuerait de se constituer sous cART dans ces sanctuaires.

- D'autres études, utilisant des modèles comparables, ne parviennent pas à déceler les traces de fluctuations génétiques dues à une réplication virale sous traitement. Dans ce cas, le rebond virémique après arrêt du traitement peut s'expliquer par la persistance d'un réservoir de génomes viraux latents, déjà constitué avant le traitement (Kearney et al., 2015). Les génomes viraux latents peuvent être intégrés ou non intégrés dans le génome des cellules cibles du virus, la forme non intégrée pouvant être circulaire ou linéaire (Bukrinsky et al., 1991; Zack et al., 1990, 1992). Ces génomes latents sont observés dans quelques cellules dendritiques et macrophages, mais surtout dans la cible majeure du virus, les LT CD4⁺ (Chun et al., 1997a; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997). Pour que le virus soit latent, les cellules doivent être dans un état dit de quiescence métabolique dans lequel les protéines virales ne sont pas ou peu exprimées. Une minorité des cellules quiescentes du réservoir se réactivent transitoirement et sont la source non seulement des pics de virémie observés occasionnellement sous cART mais aussi du rebond viral observé lors des interruptions de traitement. Dans ce manuscrit, nous nous contenterons de graviter autour de cette deuxième hypothèse, celle d'un **réservoir viral latent** dans les LT CD4⁺ quiescents.

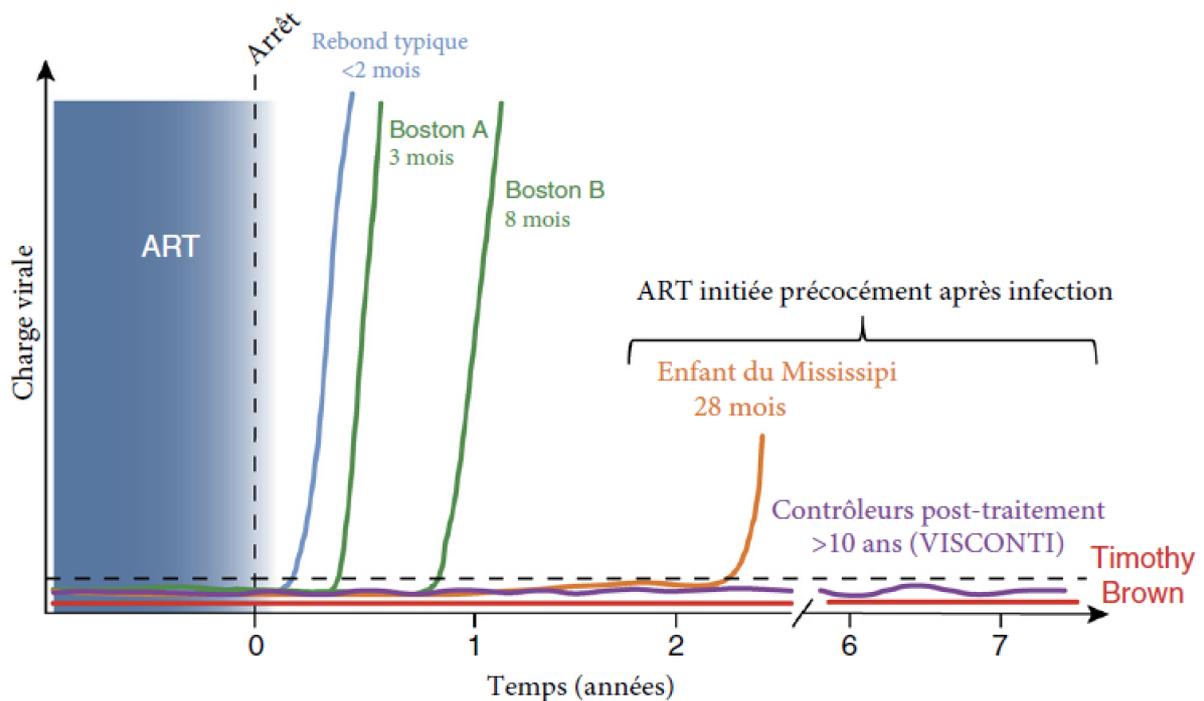


Figure 4. Résumé des délais du rebond viral. (d'après Deeks et al., 2016a)

Le rebond viral observé après arrêt des traitements antirétroviraux survient dans les 3 semaines suivant l'interruption. Dans certains cas, le délai du rebond viral est reporté de plusieurs mois chez des greffés de CSH (les patients de Boston) à plus de 2 ans chez un enfant ayant reçu un traitement antirétroviral dès le deuxième jour après sa naissance (enfant du Mississippi). Certains patients traités en primo-infection ne développent pas de rebond viral après arrêt du traitement, la virémie plasmatique étant positive mais résiduelle, ils sont nommés les Contrôleurs Post-traitement (PTC). Seul un patient ne présente aucune charge virale sans traitement, le patient de Berlin qui a reçu une greffe de CSH dont le donneur portait la mutation D32 sur son gène codant CCR5.

II.B. Cellules impliquées dans le réservoir VIH-1

II.B.1. Les monocytes, macrophages et cellules dendritiques

L'essentiel du réservoir VIH-1 sous cART semble être constitué de génomes viraux intégrés dans des lymphocytes T CD4⁺ mémoires. Le rôle des autres cellules cibles du virus dans le réservoir est plus incertain mais ne peut être complètement écarté. En effet, les séquences de génomes viraux de pics virémiques occasionnels et du rebond viral sont différentes de celles des provirus latents des LT CD4⁺, suggérant la présence d'un réservoir VIH-1 au sein d'autres types cellulaires (Bailey et al., 2006; Chun et al., 2000). L'efficacité d'infection des cellules dendritiques myéloïdes (mDC) dépend de leur état de maturation. En effet, les mDC immatures sont plus infectables et donc susceptibles de faire partie du réservoir viral (Dong et al., 2007; Granelli-Piperno et al., 1998). C'est également le cas des monocytes qui sont plus infectables que les macrophages. Parmi les monocytes, ceux CD16⁺ sont plus sensibles à la

réplication virale car ces cellules expriment peu le facteur de restriction cellulaire APOBEC3G (Ellery et al., 2007). Les monocytes CD14⁺ sont aussi relativement infectables comme le montre une comparaison faite avec les LT CD4⁺ quiescents (Zhu et al., 2002). La capacité infectieuse dépend aussi de la souche virale (Smed-Sørensen et al., 2005). La faible capacité d'infection des macrophages s'explique principalement par SAMHD1, une protéine qui transforme les dNTP en IPPP, empêchant ainsi la transcription inverse du génome virale d'avoir lieu (Laguet et al., 2011; Lahouassa et al., 2012; O'Brien, 1994). Elle peut aussi s'expliquer par la faible expression membranaire du récepteur CD4 (Nicholson et al., 1986), et de mauvaises conditions cellulaires pour l'import nucléaire du complexe de préintégration (Diamond et al., 2004). Bien que seulement 0,06 % des macrophages de la *lamina propria* de la muqueuse intestinale soit infecté, la taille de cette dernière est si importante que ces cellules ont un rôle non négligeable dans le réservoir VIH-1 (Smith et al., 2003). Des macrophages infectés sont aussi retrouvés dans les tissus adipeux (Damouche et al., 2015; Pallikkuth and Mohan, 2015). En plus des astrocytes et des cellules de la microglie, des macrophages péri-vasculaires sont aussi infectés au niveau du système nerveux central (Hellmuth et al., 2015; Marban et al., 2016). Ainsi de nombreuses cellules présentatrices d'antigènes (CPA) sont infectées dans différents compartiments.

Ces CPA participent à l'infection des lymphocytes. En effet, les DC et les macrophages peuvent aussi internaliser le virus et le relarguer à proximité des lymphocytes : ce mécanisme se nomme l'infection en *trans* (Dong et al., 2007). L'entrée virale se fait alors notamment *via* le récepteur DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2000). Ce processus a lieu lorsque ces cellules se déplacent vers les ganglions lymphatiques pour présenter les antigènes aux lymphocytes et ainsi activer l'immunité adaptative. Ces CPA, étant à proximité des LT CD4⁺, peuvent influencer leur état d'activation et donc de latence, par sécrétion paracrine de cytokines comme l'IFN- α (Meyers et al., 2007). Ces sécrétions peuvent être elles-mêmes influencées par la présence de pathogènes internalisés par ces CPA (Orenstein et al., 1997).

II.B.2. Les Lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺, principales cellules cibles du virus, sont impliqués dans le réservoir VIH-1, source du rebond viral (Coffin, 1995, cf. **Figure 5**). Ces cellules expriment à leur surface le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4 (Bleul et al., 1997). Les protéines

d'enveloppe du virus s'y fixent pour permettre l'entrée du virus dans la cellule. Toutefois, toutes les sous-populations lymphocytaires T ne sont pas susceptibles de la même manière à l'infection. En effet, bien que des cas d'infection de cellules quiescentes soient décrits, l'infection est favorisée si les cellules sont actives (Fabre-Mersseman et al., 2011). Or parmi les cellules quiescentes du réservoir, se trouvent le compartiment naïf, constitué de cellules n'ayant pas encore rencontré d'antigènes et donc n'ayant pas encore été activées, et le compartiment mémoire, résultant d'une précédente activation cellulaire suite à la rencontre d'un antigène. Ces cellules T mémoires représentent ainsi la majorité du réservoir VIH-1 des patients sous ART contrairement aux LT CD4⁺ naïfs qui n'en représentent qu'une minorité (Chomont et al., 2009). Les cellules mémoires diffèrent selon leur état de quiescence, certaines sont effectrices donc actives (T_{EM}), d'autres sont appelées centrales (T_{CM}) et sont au repos (Sallusto et al., 1999). D'autres LT CD4⁺ sont dans un état intermédiaire, les mémoires transitoires (T_{TEM}). Toutes sont différenciables par des marqueurs cellulaires à leur surface. Les T_{CM} se différencient des T_{EM} par la présence du récepteur CCR7. Et les T_{TEM} se différencient des T_{EM} par la présence du récepteur CD27. Les lymphocytes T CD4⁺ souches mémoires (T_{SCM}) contribuent aussi à la persistance du VIH au sein de l'organisme infecté (Buzon et al., 2014). Les lymphocytes mémoires se caractérisent par une demi-vie particulièrement longue d'environ 44 mois (Siliciano et al., 2003a), particulièrement pour la sous-population des lymphocytes TH1/17 (Sun et al., 2015). Ces cellules du réservoir viral peuvent ainsi subsister plus de 8 ans alors que le patient suit une trithérapie (Nottet et al., 2009). Une étude a montré que la plupart des lymphocytes mémoires infectés de manière latente présentent à leur surface un marqueur d'expression CD32A (Descours et al., 2017). Cependant, ces résultats sont controversés par de nouvelles études qui démontrent que CD32A serait d'avantage un marqueur d'activation observé à la surface des cellules nouvellement infectées (Martin et al., 2017; Osuna et al., 2017; Serra-Peinado et al., 2017).

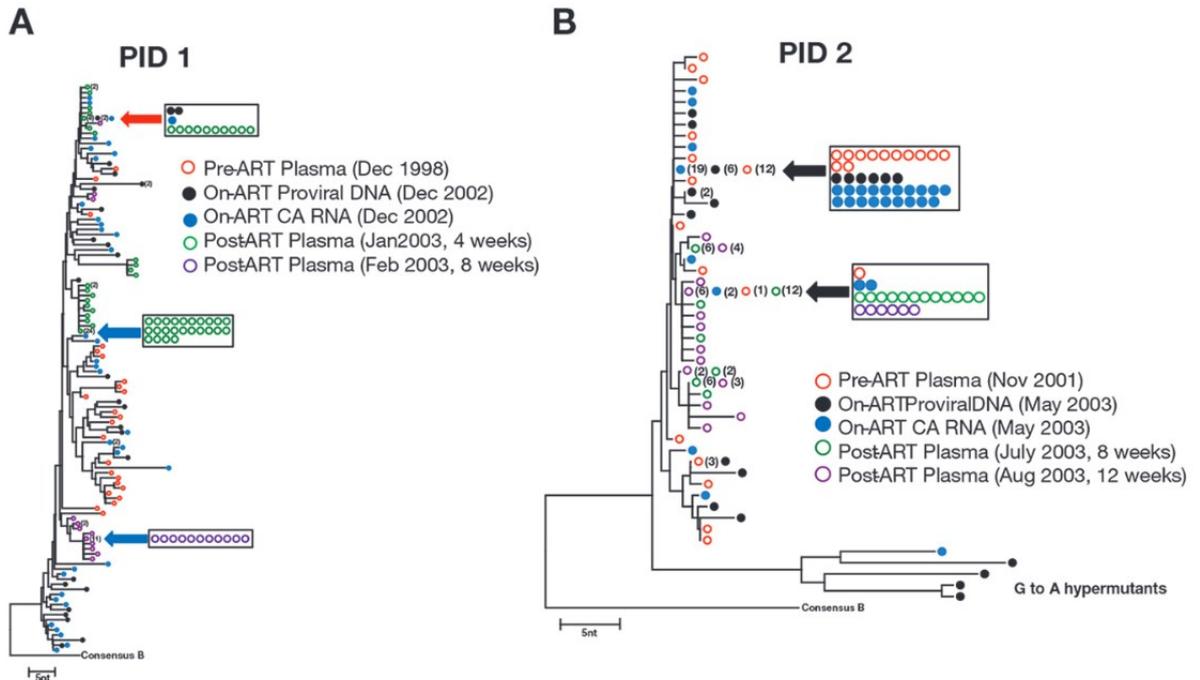


Figure 5. Similarité entre les génomes des virus du rebond et les provirus intégrés dans les LT CD4⁺ quiescents (d'après Kearney et al., 2015).

Arbre phylogénétique des séquences *gag-pol* d'ARN viral plasmatique et d'ADN extrait de PBMC avant (rond rouge), pendant (rond bleu et noir), et après cART (en vert et violet). Les flèches rouges et noirs indiquent les séquences *gag-pol* identiques entre des virus du rebond et des provirus avant arrêt du traitement. Et les flèches bleues représentent l'évolution des virus du rebond.

Deux mécanismes permettent la réactivation du réservoir viral latent des LT CD4⁺ quiescents. Le premier est l'homéostasie des lymphocytes qui permet de compenser leur déplétion. En effet, bien qu'ayant une demi-vie longue, les lymphocytes mémoires finissent par mourir (Aladdin et al., 2003; Hellerstein et al., 2003; Rathmell and Thompson, 1999). Ces phases de prolifération homéostatique périphérique vont alors permettre de compenser cette perte et de maintenir la taille des compartiments périphériques immunitaires. En effet, chez l'adulte infecté sous cART comme chez le non infecté, le thymus n'est pas le seul à restaurer les populations immunitaires périphériques par la prolifération de lymphocytes naïfs, une prolifération périphérique est aussi induite (Almeida et al., 2001; Dion et al., 2007; Tanchot et al., 1997, 2002). Chaque sous-type cellulaire est soumis à un contrôle homéostatique qui est notamment régulé par des cytokines dont principalement l'IL7, et l'IL2 pour les LT CD4⁺ (Kondrack et al., 2003; Li et al., 2003, 2004), sécrétées par des cellules stromales non hématopoiétiques (Gutierrez-Ramos et al., 1992; Heufler et al., 1993; Madrigal-Estebas et al., 1997; Oosterwegel et al., 1997; de Saint-Vis et al., 1998). En effet, elles induisent toutes deux la prolifération de cellules porteuses de récepteurs possédant une chaîne γ

commune (Ma et al., 2006; Soares et al., 1998; Swainson et al., 2006) et seul l'IL2 conduit aussi à une différenciation (Cho et al., 2000; Saraya and Balkwill, 1993). Les LT CD4⁺ quiescents subissent ainsi transitoirement des phases de prolifération homéostasique durant lesquelles le virus va sortir de son état latent si le génome du virus est intégré dans un gène nécessaire à la mitose. Dans le cas où l'individu infecté est sous antirétroviraux ce virus ne pourra se répliquer correctement et s'éteindra rapidement (cf blips observés *in vivo* sous cART, (Porter et al., 2017)). Au contraire dans le cas d'une interruption de traitement, le virus pourra en profiter pour se répandre à nouveau dans l'organisme comme en témoigne les expansions clonales retrouvées chez les virus du rebond (Maldarelli et al., 2014; Wiegand et al., 2017). Les antirétroviraux permettraient de limiter ces expansions clonales virales car une diminution du taux d'IL7 est observée dans le plasma des individus sous cART (Bolotin et al., 1999; Llano et al., 2001; Mastroianni et al., 2001; Napolitano et al., 2001).

En outre, les virus latents étant dans des cellules mémoires ayant déjà rencontré leur antigène cible, si ce dernier refait surface dans l'organisme, ces dernières vont alors sortir de leur état de quiescence comme lors des phases de prolifération homéostasique (Evans et al., 2013; Kumar et al., 2015; Stevenson et al., 1990; Zack et al., 1992). Dans ce cas, si le génome du virus a été intégré dans un gène qui était actif lors de la phase effectrice de la cellule, il va alors être exprimé et conduire la production de virus, et ceci dès que la cellule mémoire va rencontrer l'antigène contre lequel son TCR est dirigé. Ainsi la réactivation des génomes viraux intégrés dépend de la localisation du site d'intégration.

II.C. Mise en place et maintien de la latence

II.C.1. Intégration et expression du génome viral

Le VIH étant un lentivirus de la famille des *Retroviridae*, son génome code pour une enzyme, la transcriptase inverse lui permettant de rétro-transcrire son génome ARN simple brin positif en ADN double brin. Ensuite cet ADN est importé dans le noyau où il se retrouve à proximité de régions transcriptionnellement actives de l'ADN, nommées euchromatines (Han et al., 2004; Schröder et al., 2002). L'ADN viral y est alors intégré grâce à une enzyme virale appelée intégrase, principalement au sein des introns des gènes du génome cellulaire dans le sens inverse de la transcription (Ho et al., 2013; Marcello et al., 2004). L'insertion dans des

régions d'hétérochromatine est aussi possible et favorise la latence des provirus (Jordan et al., 2003). Moins d'un quart des sites d'intégration sont retrouvés au niveau d'oncogènes (Symons et al., 2017). Selon l'état de condensation de la chromatine du site d'intégration, le provirus serait plus ou moins réactivable (Battivelli et al., 2017; Sherrill-Mix et al., 2013). L'état de latence du provirus dépend ainsi de l'état d'activation de la cellule.

Le processus d'intégration permet que le génome viral soit transcrit comme les autres gènes de la cellule par l'ARN polymérase II (Chun and Jeang, 1996). Des protéines régulent l'expression du génome viral au niveau du promoteur LTR (« *long terminal repeat* ») 5' (cf. **Figure 6**), région divisée en trois segments distincts : U3 (« *Unique 3'* »), R (« *Repeat* »), et U5 (« *Unique 5'* »). Le segment U3 est composé d'une région modulatrice où se fixent des inhibiteurs ou activateurs de la transcription tels que AP-1 et NFAT, puis d'une partie où se fixent des facteurs de transcription tels que NF- κ B et Sp1, et enfin une partie appelée la TATA box où est recrutée l'ARN polymérase cellulaire. Ensuite, au sein de la région R se trouve la séquence TAR (« *trans-activation response element* ») sur laquelle se fixe la protéine virale Tat, transactivatrice de la transcription. Le reste du génome est constitué de différents cadres de lecture exprimant les polyprotéines Gag, Pol et Env et les protéines Vif, Nef, Tat, Vpu, Vpr et Rev (cf. **Figure 6**).

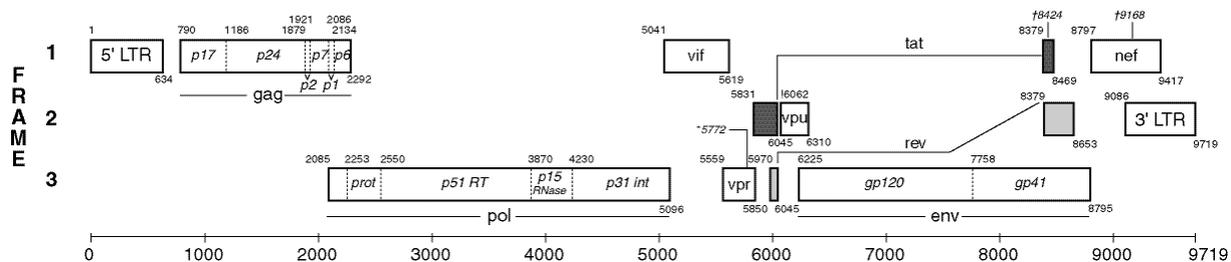


Figure 6. Génome du VIH-1.

Les protéines codées par *gag* sont des protéines de structures : la protéine de matrice p17, la protéine de capsid p24 et les protéines de nucléocapsid p7 et p6. La région *pol* code pour les enzymes : la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. Les protéines Vif, Vpr, Vpu et Nef sont dites accessoires. Les protéines Tat et Rev sont dites régulatrices. Le gène *env* code pour deux glycoprotéines gp120 et gp41. Le génome du VIH est flanqué de séquences identiques LTR en 3' et en 5'.

La transcription du génome viral permet tout d'abord la synthèse d'ARN multi-épissés codant pour les protéines Tat, Rev et Nef (Kim et al., 1989; Reddy and Yin, 1999). Puis la protéine Rev, synthétisée dans le cytoplasme, est dirigée vers le noyau grâce à son signal de localisation nucléaire. En se fixant sur la séquence RRE (« *Rev response element* ») des ARN

viraux transcrits dans le noyau, Rev les exporte dans le cytoplasme au niveau du réticulum endoplasmique limitant leur épissage (Chang and Sharp, 1990; Daefler et al., 1990; Emerman et al., 1989; Heaphy et al., 1990; Malim et al., 1989). Ainsi dans un deuxième temps, les ARN mono-épissés et les ARN non épissés sont exportés dans le cytoplasme (Arrigo et al., 1990; Guatelli et al., 1990; Schwartz et al., 1990). Les ARN mono-épissés codent pour les protéines Vpr, Vif, Vpu et Env. Les ARN non épissés codent pour les polyprotéines Gag et Pol qui sont par la suite clivées par la protéase virale. La polyprotéine Gag est clivée en protéines de structure dont la protéine de capsid p24. La polyprotéine Pol est clivée en protéines à activité enzymatique : la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. Quant à Env, elle est clivée par des protéases cellulaires nommées furines en deux glycoprotéines d'enveloppes : la gp120 et la gp41 (Freed et al., 1989; McCune et al., 1988).

II.C.2. Protéines virales impliquées dans la latence

Deux protéines virales régulatrices sont essentielles pour le contrôle de l'expression des gènes du VIH : la protéine Tat et la protéine Rev. La protéine Tat, va se lier à une séquence ARN (TAR) qui nécessite que la transcription ait atteint un certain niveau d'efficacité (Berkhout et al., 1989). Lorsque la transcription est peu efficace (niveau d'activation faible des cellules), la transcription du génome va échouer et ne produire que de fragments très courts d'ARN. Dès que l'efficacité devient meilleure, la transcription permet la synthèse de TAR, et Tat va entrer en jeu (Brady and Kashanchi, 2005). Avec cet effet de seuil, Tat va activer de façon importante la transcription des ARN viraux. Cet effet retrospectif est appelé la transactivation. La protéine Rev conduit également à un effet de seuil de production d'ARN codant pour les protéines de structure du VIH. Ce n'est que lorsque Rev aura été accumulée à un taux suffisant qu'elle pourra protéger ces ARN de l'épissage, et ainsi permettre la production de protéines de structure du VIH (Felber et al., 1989; Malim and Cullen, 1991; Malim et al., 1989). En effet, lorsque Rev est exprimée, elle permet l'export nucléaire des ARNm mono et non épissés et leur adressage au RER au détriment des ARN épissés. En absence de Rev, tous les ARNm sont épissés à de multiples sites, dont les produits de traduction sont Tat, Rev lui-même, et Nef. Alors qu'en présence de Rev, la protéine Tat entière n'est plus assez exportée vers le cytoplasme pour être traduite et l'activation de l'expression des protéines virales médiée par l'interaction Tat-TAR est alors diminuée sans pour autant s'éteindre (la protéine Tat tronquée

conserve un pouvoir activateur (Apolloni et al., 2003). Ces deux protéines via leur effet seuil induisent une expression importante du VIH qui permet la production et la transmission du virus en dépit de la vigilance immunitaire à l'écart des protéines virales immunogènes.

La transactivation est aussi influencée par l'état d'acétylation de Tat. Tat acétylée induit l'activation de la transcription des gènes viraux alors que Tat désacétylée est inactive. Tat est acétylée par différentes protéines cellulaires comme PCAF, hGCN5 et CBP (Col et al., 2001; Kiernan et al., 1999). Elle est désacétylée par d'autres enzymes cellulaires comme Sir1 (Pagans et al., 2005). En outre l'expression de Tat est dépendante de l'état d'activation de la cellule. Lorsque la cellule infectée devient quiescente, certaines régions d'euchromatine se condensent en hétérochromatine. Ainsi en fonction du site d'intégration du génome viral, la chromatine est plus ou moins condensée. L'état de la chromatine influence l'expression basale des gènes viraux dont celle de Tat (Jordan et al., 2001). Si un niveau basal d'expression du génome viral n'est pas maintenu, la transactivation de Tat va s'éteindre (Weinberger et al., 2005). Des modifications épigénétiques permettant la décondensation de la chromatine sont ainsi essentielles pour restaurer l'action de Tat (Pearson et al., 2008). En outre, un facteur de transcription nommé Luman, étant séquestré par l'enveloppe virale et plus précisément par la gp41, ne peut alors plus inhiber la transactivation médiée par Tat (Blot et al., 2006). Ainsi une fois la latence levée, l'enveloppe néo-synthétisée renforce la réactivation des provirus.

Les protéines virales Nef et Vpr influencent aussi la latence des provirus. Nef régule négativement le LTR inhibant l'expression virale (Ahmad and Venkatesan, 1988). Cette protéine bloque également la cellule en phase G1 en inhibant l'entrée en phase S (Ndolo et al., 2002). Ces deux processus favorisent un état de quiescence de la cellule infectée. En opposition, cette protéine active les cellules infectées par différentes voies dont celles des kinases tel que Ras, MAPK et Lck (Fujinaga et al., 1995; Geleziunas et al., 1996; Hanna et al., 1998; Tobiume et al., 2002), et celle du TCR associé à CD8 impliquant l'activation de l'expression d'IL-2 (Wang et al., 2000). Son activité dépendrait de sa localisation cytoplasmique ou membranaire (Baur et al., 1994; Marsh, 1999). Quant à Vpr, cette protéine bloque la cellule en phase G2 en inhibant la mise en place de la mitose (Stewart et al., 1997), or durant la phase G2, la transcription dans ces cellules reste active. Elle participe ainsi à la réactivation des cellules quiescentes en activant les facteurs de transcription cellulaires agissant sur le LTR comme p300, TFIIB, TFIIF, Sp1, GR et NF- κ B (Agostini et al., 1996; Felzien et al., 1998; Kino et al., 2002; Levy et al., 1995; Vanitharani et al., 2001; Verhoef et al., 1999;

Wang et al., 1995). Ainsi les protéines virales impliquées dans la mise en place et le maintien de la latence sont dépendantes de facteurs cellulaires.

II.C.3. Les facteurs cellulaires de la latence

Pour que la transcription soit possible, l'ADN doit passer de la conformation d'hétérochromatine à la celle d'euchromatine, c'est-à-dire subir des modifications épigénétiques. Les modifications épigénétiques se différencient en deux types : (1) la modification des histones et donc le changement de conformation des nucléosomes et (2) l'état de méthylation de l'ADN surtout au niveau des régions promotrices. Le promoteur du génome du VIH se situe au niveau des LTR. La mise en place de la latence est liée à différents mécanismes. Tout d'abord, la déacétylation des histones Nuc1 et Nuc2 situés au niveau du LTR change la conformation de l'ADN le rendant plus compact et donc moins accessible à l'ARN polymérase (Coull et al., 2000). La présence d'histones déacétylases (HDAC) au niveau du LTR permet ainsi de maintenir la latence. Des protéines cellulaires comme Myc recrutent les HDAC au niveau du promoteur des provirus intégrés dans le génome de cellules du réservoir, notamment celui de lymphocytes T CD4⁺ quiescents (Jiang et al., 2007). En outre, la tri-méthylation des histones, notamment de l'histone H3, est également nécessaire pour le passage vers une conformation d'hétérochromatine. La molécule HP1 serait recrutée par les histones triméthylés par SUV39H1 pour maintenir la latence dans les lymphocytes T quiescents (Chéné et al., 2007; Cheutin et al., 2003). Les états d'acétylation, de méthylation, de phosphorylation, de sumoylation, et d'ubiquitination des histones sont ainsi impliqués dans la mise en place et le maintien de la latence (Redel et al., 2010). La deuxième modification épigénétique possible est la méthylation de l'ADN. Une hyper-méthylation de deux îlots CpG a été observée au niveau du site d'initiation de la transcription du génome viral (Blazkova et al., 2012; Ishida et al., 2006). Leur méthylation permet le recrutement de protéines identifiées comme régulatrices de la latence comme HDAC2 et MCB2 (Kauder et al., 2009).

D'autres protéines agissent sur des facteurs de transcription soit en provoquant leur dégradation, soit en les recrutant, soit en les sur-exprimant, soit en les séquestrant. Par exemple, la protéine Murr-1 séquestre le facteur de transcription NF-κB dans le cytoplasme, empêchant ainsi l'activation de l'expression virale par cette dernière (Ganesh et al., 2003). En effet la séquence U3 du promoteur viral possède trois sites de liaison à NF-κB (Rabson and Lin,

2000). Dans les cellules de la microglie, d'autres protéines semblent impliquées dans la latence. Le facteur de répression de transcription CTIP2 recrute des HDACs tels que HP1 et SUV39H1 ; il inhibe en outre l'expression de la protéine p21 impliquée dans l'activation de l'expression virale (Marban et al., 2007; Rohr et al., 2003). L'action de CTIP2 a aussi été retrouvée dans les LT CD4⁺ (Le Douce et al., 2012). Les facteurs cycT1 et CDK9 font partie avec la protéine virale Tat d'un complexe nommé P-TEFb qui est nécessaire à l'activation de la transcription *via* TAR. Pour être associée au complexe, CDK9 doit être phosphorylée. Si CDK9 n'est pas phosphorylée et donc ne s'associe pas aux autres protéines pour former le complexe fonctionnel P-TEFb (Garber et al., 2000), la transactivation de l'expression du génome viral *via* TAR est inhibée. Ainsi dans les cellules quiescentes du réservoir, les protéines CDK9 déphosphorylées pourraient participer à la latence. Quant à cycT1, elle serait sous-exprimée dans les macrophages différenciés (Liou et al., 2002).

Enfin, l'expression virale peut être réprimée par des micro-ARN (miARN) au niveau post-transcriptionnel. Ces derniers sont capables de se fixer par complémentarité aux ARNm codant pour les protéines Tat et Rev par exemple, et ainsi d'inhiber leur traduction ou de provoquer leur dégradation (Huang et al., 2007).

L'état d'activation de la cellule dépend aussi du type cellulaire impliqué et de l'environnement dans laquelle elle se trouve.

II.D.Constitution génétique et quantification du réservoir VIH-1

II.D.1.Quantification des provirus latents

Au sein de la cellule infectée, l'ADN viral est retrouvé dans le noyau sous différentes formes : linéaire non intégré ou intégré, circulaire à un LTR ou à 2 LTR. De l'ADN viral est également observé dans le cytoplasme sous forme linéaire. Afin de quantifier ces différentes formes d'ADN viral, différentes techniques ont été mises en place. Pour la quantification de l'ADN total, la réaction de polymérase en chaîne (PCR) en temps réel (qPCR) sur le gène *gag* a été utilisée. Cette technique a permis de montrer que 3 mois de traitement antirétroviral permettent de réduire seulement d'un facteur 10 la quantité de LT CD4⁺ quiescents porteurs de génomes viraux latents (Perelson et al., 1997). Pour cibler l'ADN intégré, les amorces sont complémentaires des séquences ALU retrouvées dans le génome humain et de la séquence

virale LTR. Une PCR, suivie d'une migration sur un gel d'électrophorèse, d'un transfert sur membrane et d'une hybridation Southern (« *Southern Blot* », SB) a été utilisée par Chun *et al.* pour quantifier l'ADN viral intégré dans les PBMC de patients sous antirétroviraux. Il a ainsi montré qu'en moyenne sur 13 patients la fréquence de génomes viraux intégrés est de 324 copies par million de cellules LT CD4⁺ quiescents (Chun *et al.*, 1997a). La quantité d'ADN intégrés dans les LT CD4⁺ quiescents diminue très lentement sous cART avec un temps de demi-vie de 44 mois. Basé sur ce nombre, il faudrait 74,3 années pour éradiquer le virus. Ainsi le réservoir VIH-1 semble pouvoir persister très longtemps sous cART. (Finzi *et al.*, 1999; Siliciano *et al.*, 2003b). D'autres équipes ont également mesuré le réservoir VIH-1 par qPCR et ont montré que ce dernier n'est pas affecté par les virémies intermittentes (Torres-Cornejo *et al.*, 2014). D'après cette technique, la fréquence de génomes intégrés est de plus de 1000 copies par million de LT CD4⁺ quiescents (Ho *et al.*, 2013). Les méthodes de quantification des ADN viraux non intégrés n'est pas à négliger car une étude récente montre que les ADN circulaires pourraient se linéariser pour s'intégrer dans le génome cellulaire et ainsi participeraient au réservoir VIH-1 (Thierry *et al.*, 2015). En fonction de la cible des amorces de la PCR, la quantification des différentes formes circulaires non intégrées est réalisable et celle des formes linéaires non intégrées est distinguable des intégrés par une ligation avec un ADN de liaison (Munir *et al.*, 2013). Enfin ces dernières années, la technique de la PCR digitale (dPCR) est très utilisée car très sensible ; en effet tous les fragments d'ADN sont séparés par une émulsion organique avant d'être quantifiés. Après amplification et quantification, il est nécessaire de caractériser qualitativement le réservoir VIH-1 (cf. I.D.3).

II.D.2.Composition génétique du réservoir VIH-1

Afin de savoir si les séquences du réservoir VIH-1 quantifiées par qPCR sont intactes, c'est-à-dire capables de coder une protéine, il faut regarder par séquençage si elles n'ont subi ni délétion, ni mutation, ni insertion. La mutation la plus fréquente au sein des génomes VIH est la mutation G→A effectuée par le facteur de restriction cellulaire APOBEC3G, dont l'accumulation est nommée hypermutation. Une étude a montré que 11,7% des provirus non induits après réactivation des LT CD4⁺ quiescents (dont la protéine Gag n'est pas exprimée) seraient intacts (Ho *et al.*, 2013). Tous les autres génomes séquencés présentent en effet des mutations ou des délétions (Ho *et al.*, 2013). Après avoir été amplifiés par PCR nichée, les

provirus ont été séquencés directement sans clonage. La PCR a révélé que 45% des provirus comportent des délétions importantes visibles sur gel d'agarose 1%. Les séquences obtenues sont bien issues d'un seul provirus et non le fruit d'une recombinaison entre plusieurs séquences car les PCR avant séquençage sont effectuées en dilution limite. Le séquençage a révélé 32,4 % de provirus hypermutés par le facteur de restriction APOBEC3G, ainsi que des mutations dans le site donneur majeur d'épissage (MSD) et des insertions et délétions à un seul nucléotide (INDEL), notamment dans le site du signal d'encapsidation.

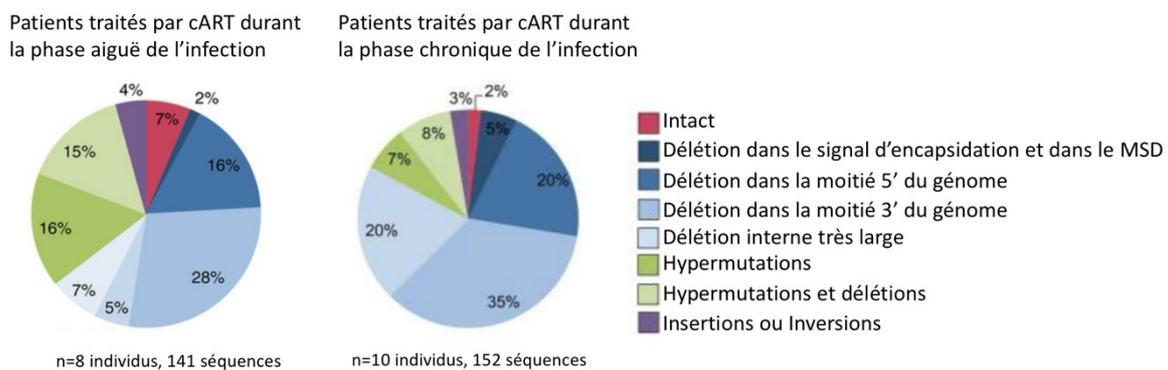


Figure 7. Composition du réservoir VIH-1 (d'après Bruner et al., 2016).

Résumé du séquençage de provirus provenant soit de patients traités par cART durant la phase chronique de l'infection, soit de patients traités en primo-infection. Le séquençage a été réalisé sur tout le génome VIH de LT CD4⁺ quiescents isolés. Chaque séquence provirale est indépendante et clonale car les PCR sont effectuées en dilution limite avant séquençage. Les délétions, les mutations, les insertions et les hypermutations sont indiquées sur chaque diagramme circulaire avec différentes couleurs comme indiqué ci-dessus.

Une étude plus récente, comprenant plus de sujets, et séquençant tous les génomes entiers démontre que chez les individus traités par cART durant la phase chronique de l'infection, seul 2% du réservoir VIH-1 des LT CD4⁺ quiescents présente des génomes intacts (Bruner et al., 2016, cf. **Figure 7**). Cette différence entre les deux études peut s'expliquer par la population de cellules sur laquelle a été fait le séquençage. Dans la première étude, le séquençage était effectué sur les LT CD4⁺, *gag* positifs (Ho et al., 2013). Alors que dans la deuxième étude le séquençage est effectué sur tous les LT CD4⁺, ce qui permet de ne pas manquer les séquences ayant des délétions dans leur gène *gag* (Bruner et al., 2016, cf. **Figure 7**). Dans cette deuxième étude, le réservoir VIH-1 de patients infectés en primo-infection est aussi séquencé. Bien que le pourcentage de séquences intactes chez ces patients soit de 7%, il n'est pas significativement différent de celui des patients traités en phase chronique. En

revanche, le pourcentage de séquences hypermutées varie significativement entre ces deux groupes. Cette différence suggère que le processus d'hypermutation commence dès la primo-infection. Le défaut majeur des réservoirs VIH-1 des patients reste la délétion, pouvant s'étendre de 15pb à 8kb (cf. **Figure 7**). Les délétions affectent notamment des régions du génome nécessaires au cycle de réplication du virus comme le signal d'encapsidation et le site donneur majeur d'épissage (MSD, **Figure 7**). Ainsi, malgré la quantité importante de cellules « réservoir », peu comportent des génomes VIH intacts susceptibles de produire des virions après réactivation.

II.D.3. Quantification du réservoir VIH-1 fonctionnel

II.D.3.1. Quantification des ARNv associés aux cellules réactivées

Des techniques ciblant la quantification du réservoir VIH-1 des LT CD4⁺ quiescents, dont l'expression est induite après réversion de la latence, ont été développées. La mesure des ARNv associés aux cellules peut s'effectuer par deux techniques : TILDA et iCARED. La méthode TILDA (« *Tat/rev Induced Limiting Dilution Assay* ») est basée sur l'activation de LT CD4⁺ totaux par la PMA et l'ionomycine en dilution limite pendant 12h. La quantification du réservoir VIH-1 réactivable se fait alors par une RT-qPCR sur les ARNm épissés des protéines Tat et Rev (Lee et al., 2016; Procopio et al., 2015). Elle permet de quantifier 48 fois plus de production virale qu'un ELISA classique et ne nécessite qu'un million de LT CD4⁺. La méthode iCARED (« *inducible cell-associated RNA expression in dilution* »), quant à elle basée sur les dilutions limites de LT CD4⁺ quiescents, est caractérisée par l'ajout de raltégravir pour inhiber la production virale afin de quantifier uniquement les virus néo-synthétisés au bout 3 jours d'activation par des anti-CD3/CD28. Après extraction des ARNv des cellules et du surnageant, l'amplification se fait sur les ARN *gag*, *tat* et *rev* par RT-PCR. Enfin, la quantification est effectuée par dPCR. Cette technique permet une quantification absolue, plus sensible que la qPCR et ainsi une détection des faibles variations d'expression (Hodel et al., 2016).

II.D.3.2. Quantification des virus émergent du réservoir VIH-1

Parmi les provirus intégrés des LT CD4⁺ quiescents, une très faible minorité est « apparemment » intacte. Afin de savoir si ces derniers sont capables de produire des virus, différentes techniques ont été développées. Une des premières techniques à avoir été développée est le VOA (« *viral outgrowth assay* », (Laird et al., 2013)). Tout d'abord, des LT CD4⁺ quiescents de patients traités et dont la virémie est inférieure à 500 copies d'ARNv/ml sont activés avec de la PHA en présence d'IL-2. Puis, ces cellules sont mises en coculture avec des LT CD8⁺ irradiés de donneurs sains. Après 14 jours d'incubation, la protéine de capsid p24 du VIH-1 est dosée par ELISA à partir du surnageant. Les premières études montrent que 1,6 cellules en moyenne sur un million de LT CD4⁺ quiescents seraient capables de production virale (Chun et al., 1997a). Comme le dosage par p24 est croissant sur plusieurs jours, les virus issus de ces activations sont infectieux (Finzi et al., 1997). Une étude plus récente, menée sur des patients dont la virémie est indétectable sous cART, démontre que la quantité des séquences intactes est en moyenne 60 fois supérieure à la quantité d'unité infectieuse par million de LT CD4⁺ quiescents mesurée par qVOA (cf. **Figure 8**, Ho et al., 2013). Selon les auteurs, ce phénomène serait explicable par le caractère stochastique de l'expression des provirus intacts latents réactivés. En effet, après une nouvelle stimulation des LT CD4⁺ quiescents de VOA dont les surnageants étaient p24 négatifs, des virions émergent car la protéine de capsid est cette fois-ci détectée.

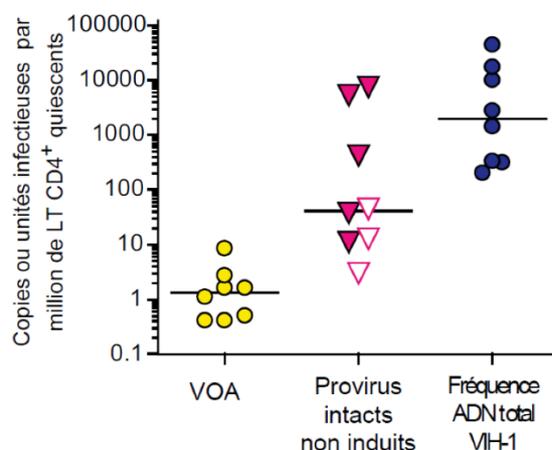


Figure 8. Quantification du réservoir viral total, intact et fonctionnel (d'après Ho et al., 2013).

L'ADN total du réservoir VIH (en bleu) est mesurée par qPCR ALU, la proportion de séquences intactes (en rose) est déterminée par séquençage. La quantité de virus, émergent à partir de LT CD4⁺ quiescents réactivés (en jaune) par des billes CD3-CD28, est mesurée par VOA. Les LT CD4⁺ quiescents sont isolés à partir de PBMC de patients traités par cART dont la virémie est inférieure à 50 copies ARNv/ml depuis au moins 6 mois.

De nouvelles techniques tentent de mieux représenter le réservoir VIH-1 fonctionnel. La méthode Simoa utilise un dosage ELISA ultrasensible utilisant des billes paramagnétiques couplées à des anticorps et permet de détecter ne serait-ce que 2,5 fg de p24/ml correspondant à environ 60 copies d'ARNv/ml (Wilson et al., 2016).

Enfin, une méthode appelé TZA (TZM.bl assay) quantifie le nombre de cellules pouvant produire des virus capables d'entrer dans une cellule cible (Sanyal et al., 2017). Cette technique est basée sur la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule cible reportrice. Les LT CD4⁺ quiescents sont réactivés par des billes anti-CD3 et anti-CD28 puis sont mis en coculture avec des cellules HeLa TZM.bl. Ces cellules possèdent un gène rapporteur beta-galactosidase sous le contrôle d'un promoteur dépendant de TAR et expriment le récepteur ainsi que les co-récepteurs du VIH-1. La fusion entre la cellule HeLa et le virus néo-synthétisé permet donc l'activation du gène rapporteur par Tat. D'après cette technique, la quantité de virus réactivable est de 46,9 unités infectieuses par million de LT CD4⁺ quiescents. Ainsi, les résultats obtenus par VOA et TZA montrent un écart important entre le nombre de séquences intactes du réservoir VIH-1 et celles capables de produire un virus répliatif.

II.D.4.Expansion clonale des cellules du réservoir VIH-1.

D'après le séquençage du gène codant la transcriptase inverse des génomes latents, une proportion non négligeable de ces séquences sont identiques entre elles et à celles de virus issus de sang de patient présentant des virémies résiduelles sous cART à différents instants (Bailey et al., 2006). De plus, les séquences *gag-pol* de provirus intégrés latents et de virus du rebond sont également identiques. Ces résultats suggèrent une expansion clonale des LT CD4⁺ quiescents (cf **Figure 5**, Kearney et al., 2015). Afin de démontrer leur clonalité, différentes équipes ont séquencé le site d'intégration de ces provirus identiques. Dans l'étude de Maldarelli, les génomes VIH des LT CD4⁺ quiescents sont coupés et couplés à des petits ADN de liaison puis amplifiés par PCR avec une amorce liant l'ADN de liaison et une amorce liant le LTR du virus. Or, après analyse du séquençage haut débit des amplicons, les sites d'intégration de certains provirus se sont révélés également identiques. Cette observation démontre la présence d'expansion clonale de LT CD4⁺ quiescents participant au réservoir VIH-1 (Maldarelli et al., 2014). Une étude a été menée sur quatre patients traités par cART en utilisant le

séquençage à génome unique sur les ADN et les ARN associés aux cellules (CARD-SGS). Cette étude a permis de mieux caractériser le réservoir VIH-1 (Wiegand et al., 2017). En effet, les séquences amplifiées sont celles des gènes de la protéine p6, de la protéase et de la transcriptase inverse. Les expansions clonales sont stables au cours du temps, au moins sur plusieurs mois. Pour deux patients, des séquences hypermutées se sont révélées clonales. Leur hypermutation pourrait favoriser leur persistance au sein d'expansions clonales car les ARN hypermutés ne conduisent pas à la synthèse de protéines reconnaissables par les cellules cytotoxiques du système immunitaire. Cette analyse par CARD-SGS montre que ces séquences bien qu'hypermutées sont transcrites en ARNm. Une analyse quantitative et qualitative du VOA de quatre patients (Q²VOA) montre également la présence de nombreux clones au sein du réservoir VIH (Lorenzi et al., 2016). Dans cette dernière étude, le gène de l'enveloppe des virus qui ont émergé lors des VOA, ainsi que celui des génomes intégrés des LT CD4⁺ quiescents ont été séquencés. 54% des virus émergeant du réservoir VIH-1 ont un gène de l'enveloppe qui est identique à au moins celui d'un autre virus, preuve de clonalité car le VOA est effectué en dilution limite. Cette étude montre aussi que la taille du clone proviral est inversement proportionnelle à sa probabilité de réactivation. Ainsi plus le clone regroupe de provirus, plus ils ont une forte probabilité d'être défectifs.

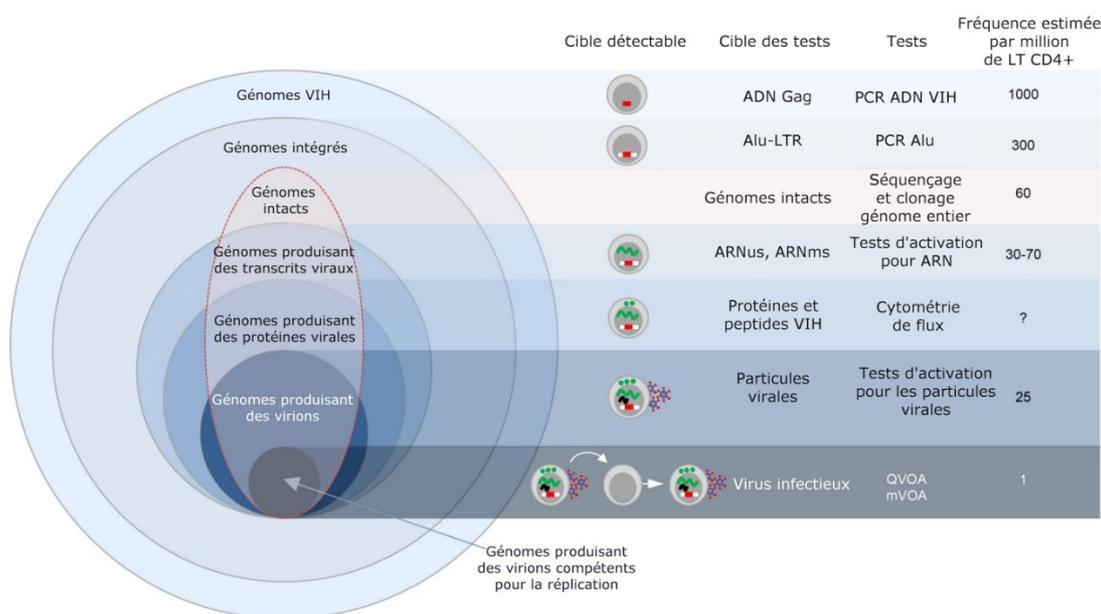


Figure 9. Résumé des méthodes de quantification du réservoir VIH (d'après Deeks, et al., 2016a).

Les génomes intégrés sont déterminés par une PCR ALU, les génomes intacts par séquençage, les ARN non épissés ou multi-épissés par PCR sur une extraction de LT CD4⁺ quiescents réactivés, les protéines virales par des tests ELISA sur des cultures de LT CD4⁺ quiescents réactivés, les virions néo-synthétisés par de LT CD4⁺ quiescents réactivés par TZA et enfin les virus infectieux, émergeant du réservoir, sont quantifiés par qVOA. (US = unspliced,; MS = multiply spliced; QVOA = quantitative viral outgrowth assay; MVOA = murine viral outgrowth assay)

Toutes ces études résumées dans la **Figure 9** (Deeks et al., 2016b) montrent qu'une faible proportion des génomes intégrés sont intacts. Parmi les génomes intacts, peu sont capables d'induire l'expression d'ARN, et sont encore moins susceptibles de produire des virions capables de réplication. La faible proportion de provirus fonctionnels au sein du réservoir VIH-1 peut s'expliquer par le fait que la plupart des provirus fonctionnels soient éliminés par les cellules immunitaires cytotoxiques lors des réactivations transitoires homéostatiques des LT CD4⁺ quiescents. Ainsi subsisteraient, au sein du réservoir VIH-1 des patients traités par cART, principalement des clones de séquences défectives. En revanche, les raisons de la différence de proportion entre les séquences intacts et celles fonctionnelles mesurées par VOA restent encore incomprises.

II.E. Vers une rémission fonctionnelle ou une guérison

Un seul patient, dit le « patient de Berlin », a véritablement guéri de l'infection du VIH (Hütter et al., 2009) ou du moins présente une virémie plasmatique indétectable (cf. **Figure 4**). Ce patient, souffrant d'une leucémie, nécessitait une transplantation de cellules souches (TCS) hématopoïétiques. Après une ablation de ses cellules souches hématopoïétiques par chimiothérapie et une transplantation, les cellules immunitaires du greffon vont reconnaître comme étrangères celles du receveur et donc les éliminer. Le cancer lié à ces cellules disparaissant avec elles : cet effet du greffon contre la maladie du receveur est appelé GvM (Graft versus Malignancy). Dans le cas du patient de Berlin, le donneur portait la mutation delta 32 sur le gène codant pour le corécepteur CCR5 du VIH. Cette mutation provoque l'apparition d'un codon stop prématuré qui conduit à la synthèse d'une protéine tronquée non exprimée à la surface des cellules. Les cellules du greffon n'étant pas infectables par le virus R5 tropique, ce dernier n'a pu se propager à nouveau au sein de l'organisme receveur. Aucune virémie n'a été détectée depuis chez ce patient. Chez d'autres patients comme ceux de Boston, qui ont subi également une chimiothérapie et une TCS d'un donneur ne portant pas la mutation, le virus arrive à se propager au sein des cellules du donneur (Henrich et al., 2014, **Figure 4**). Ces infections *de novo* se font à partir de cellules du réservoir VIH-1 qui n'ont pas pu être éliminées à temps par les cellules du greffon ou par la chimiothérapie. En effet,

cette dernière ne peut atteindre toutes les cellules infectées surtout celles qui sont dans des sanctuaires anatomiques. (Cf I.A.1).

Le fait de traiter dès la primo infection permet de limiter la réplication virale (Yerly et al., 2000), de diminuer la taille du réservoir VIH-1 (Ngo-Giang-Huong et al., 2001) et la diversité des quasi-espèces (Delwart et al., 2002) mais également de préserver l'immunité (Oxenius et al., 2000). Après ces observations, le suivi de la cohorte Visconti (pour *international-Viro-Immunologic Sustained CONtrol after Treatment Interruption*) a permis de mettre en lumière des cas de guérison fonctionnelle chez des patients ayant commencé leur traitement dès la primo-infection ((Cockerham et al., 2016; Hocqueloux et al., 2010; Sáez-Cirión et al., 2013). Dans cette cohorte, les patients après arrêt de leur traitement ne présentent pas de virémie, ils sont nommés PTC pour « *Post-Treatment Controllers* » (cf. **Figure 4**). Parmi les patients traités en primo-infection, peu sont des PTC. En effet, la majorité présente un rebond virémique tardif (Rosenberg et al., 2000; Seng et al., 2008) . C'est notamment le cas de l'enfant du Mississippi qui a reçu un traitement antirétroviral dès 30h après sa naissance, et dont la virémie plasmatique a été indétectable pendant 4 ans avant un rebond virémique survenu 28 mois après arrêt du traitement (Butler et al., 2015; Persaud et al., 2013). Certaines cytokines comme l'IL-21 et l'IFN- α permettent de retarder le rebond virémique de quelques semaines sans pouvoir véritablement l'éviter (Micci et al., 2017). Certaines combinaisons d'antirétroviraux permettent de retarder également le rebond comme en témoigne l'étude EMERALD (Molina et al., 2017). Même en traitant lors de la phase hyper-aiguë de l'infection, la virémie peut redevenir supérieure à 30 copies/ml après arrêt du traitement (Henrich et al., 2017a).

II.E.1. Réversion de la latence et élimination du réservoir VIH-1

Afin d'éradiquer le réservoir viral, des stratégies visant à activer l'expression des provirus latents des LT CD4⁺ quiescents et l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ se développent. Le cycle de réplication du virus n'étant pas toujours lytique pour la cellule, il faut en effet activer en parallèle les cellules NK (« *Natural killer* ») et les LT CD8⁺ cytotoxiques pour éliminer les cellules réactivées productrices de virions et ainsi éliminer le réservoir VIH-1.

II.E.2. Agents de réversion de la latence

Différents agents de réversion de la latence (LRA) ont été testés. Ces agents agissent sur l'activation des LT CD4⁺ quiescents pour lever la latence virale. *In vivo* les lymphocytes sont activés *via* différents récepteurs membranaires suite à la présentation d'un antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité. La transmission du signal *via* ces récepteurs membranaires conduit à l'activation de facteurs de transcription qui vont alors induire l'expression de gènes nécessaires à la prolifération des lymphocytes (Smith-Garvin et al., 2009). Parmi ces facteurs de transcription, certains comme SP1 et NF-κB sont nécessaires à l'expression du génome viral et vont ainsi être activés permettant la réversion de la latence dans les LT CD4⁺ quiescents (cf. II.C.3). *In vitro*, des anticorps dirigés contre les récepteurs membranaires CD3 et CD28 (cluster de différenciation 3 et 28) permettent d'activer des LT CD4⁺ quiescents (Kay, 1991). La phytohémmagglutinine (PHA) permet également l'activation des lymphocytes *via* CD3 *ex vivo* (Chilson and Kelly-Chilson, 1989). Lors de cette activation cellulaire, l'expression de cytokines, dont les interleukines, va permettre d'amplifier le signal. La mise en culture des lymphocytes activés avec de l'interleukine 2 (IL2), permet de renforcer leur activation (Costello et al., 1993). Comme CD3 et CD28 activent différentes voies conduisant à l'activation de facteurs de transcription, une co-stimulation est préférable pour optimiser la réversion de la latence (Frauwirth and Thompson, 2002; Levine et al., 1996). *In vivo*, un traitement combinant ces molécules a été testé mais s'est révélé toxique (Prins et al., 1999). En effet, les patients traités par OKT3, un anticorps murin monoclonal dirigé contre CD3, ont développé des anticorps contre OKT3. Quant à l'IL2, elle a provoqué différents effets secondaires tels que de la fièvre, des nausées, et une anémie. Actuellement, ces molécules sont utilisées uniquement *in vitro*, notamment pour réactiver les LT CD4⁺ quiescents lors des VOA (cf. II.D.3.2). Quant à la PHA, en plus d'être mitogène, cette lectine est toxique car elle induit notamment l'agglutination des globules rouges (Miyake et al., 2007; Vasconcelos and Oliveira, 2004).

Des molécules inhibitrices des HDAC (HDAC_i, cf. **Figure 10**), permettant de modifier les marques épigénétiques des génomes latents, sont efficaces pour la réactivation des LT CD4⁺ quiescents *in vitro*. L'Acide valproïque est le premier HDAC_i à avoir été testé cliniquement (Lehrman et al., 2005). Son étude *in vivo* a donné beaucoup d'espoir à la communauté scientifique déçue par d'autres essais cliniques menés quelques années après (Archin et al.,

2008, 2010; Routy et al., 2012). Un autre HDAC_i, le Varinostat, appelé aussi SAHA, permet une augmentation de l'expression du gène *gag* des LT CD4⁺ quiescents *in vivo* (Archin et al., 2012) sans être trop toxique pour l'organisme (Lee et al., 2010). Le Panobinostat, plus efficace que le Varinostat est déjà utilisé contre les myélomes (Li et al., 2014). Il permet *in vitro* (Rasmussen et al., 2013) comme *in vivo* (Rasmussen et al., 2014) d'activer les cellules du réservoir VIH-1 comme en témoigne la quantité de marqueurs d'activation CD69, celle d'ARN viraux non épissés et celle de p24. Une étude de comparaison d'HDAC_i *in vitro* (Wei et al., 2014) a permis de mettre en valeur la Romidepsin. Cet HDAC_i permet d'activer *in vivo* les cellules du réservoir VIH-1, chez des patients avirémiques traités par cART. En effet, de l'ARN viral est alors détecté à nouveau dans le plasma. (Søgaard et al., 2015). Cependant, les HDAC_i ne permettent pas une réelle réduction de la taille du réservoir VIH-1 *in vivo*. Ce phénomène peut être expliqué, entre autres, par l'inhibition de la sécrétion d'IFN γ et la diminution de l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ activés par les LRA (Jones et al., 2014; Rasmussen and Lewin, 2016).

L'activation de la transcription nécessite en outre que les histones soient déméthylées et que l'ADN soit méthylé. Des inhibiteurs de méthyl-transférases (HMT_i, cf. **Figure 10**) comme BIX 01294 et la chaetocine permettent de réactiver en partie l'expression du VIH *in vitro* et *ex vivo* (Bouchat et al., 2012). Des inhibiteurs de méthylation de l'ADN en combinaison avec des HDAC_i ont aussi permis de réactiver le réservoir VIH-1 *in vitro* et *ex vivo*, notamment le 5-Azadc (Bouchat et al., 2016).

Une autre classe de LRA est composée d'esters, agonistes de la protéine Kinase C (PKC, cf. **Figure 10**), capables d'activer l'expression du facteur de transcription NF- κ B ou de le libérer de complexes inhibiteurs. Par exemple, la prostratine active la voie PKC et, utilisée avec d'autres HDAC_i, elle permet d'activer l'expression des provirus latents (Reuse et al., 2009). L'action synergique des combinaisons de LRA est indispensable pour renforcer l'expression virale. La prostratine associée à la Calcineurine permet de mieux activer l'expression virale *in vitro* *via* NF- κ B (Chan et al., 2013). Il existe de nombreux analogues de la prostratine pouvant être utilisés en clinique (Beans et al., 2013; Jiang and Dandekar, 2015). Par exemple, la molécule ingenol-3-hexanoate, issue de la plante amazonienne *Euphorbia tirucalli*, agit non seulement sur la voie PKC pour inverser la latence mais elle est aussi capable d'inhiber la réplication virale en diminuant l'expression des récepteurs membranaires (Abreu et al., 2014; Jiang et al., 2014; Pandeló José et al., 2014). Cette molécule serait donc une bonne candidate à tester *in vivo*. En outre le cofacteur de NF- κ B, pTEFb (« *Positive transcription elongation*

factor b »), nécessaire aussi à l'activation du LTR, est séquestré en temps normal au sein d'un complexe dans le cytoplasme. Sa libération par des protéines possédant un domaine BET comme JQ1 (Li et al., 2013) et HMBA (Chen et al., 2016) permet d'inverser la latence dans les LT CD4⁺ quiescents *in vitro*. La combinaison de JQ1 et d'un agoniste de PKC permet d'obtenir *ex vivo* une activation de l'expression virale similaire à celle obtenue avec une activation CD3-CD28 dans les LT CD4⁺ quiescents (Darcis et al., 2015).

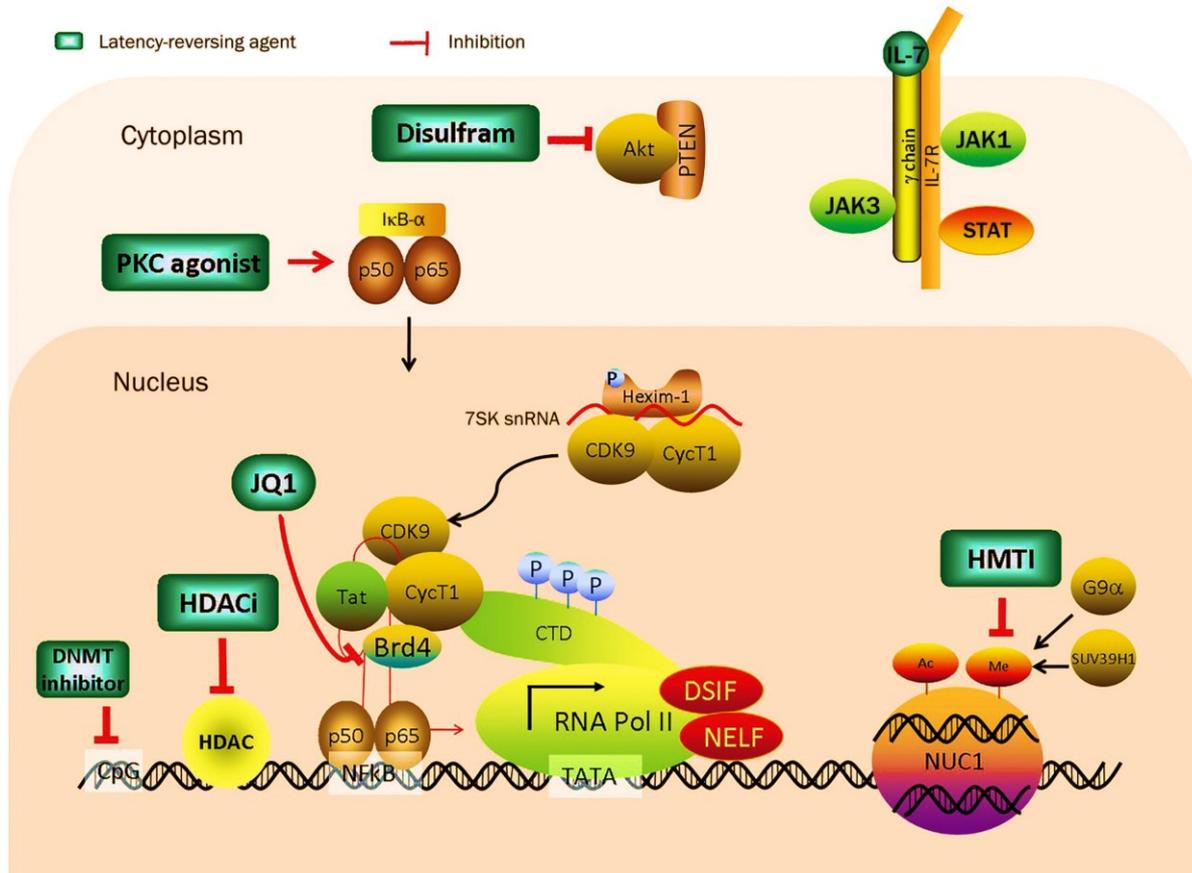


Figure 10. Schéma résumant les mécanismes d'action des LRA (d'après Shang et al., 2015).

Les agonistes de PKC comme la prostratine et la brystatine, induisent la phosphorylation et la dégradation des inhibiteurs IκB-α de NF-κB. L'hétéro-dimère p65/p50 composant NF-κB, libéré d'IκB-α dans le cytoplasme peut aller se fixer sur le LTR dans le noyau pour initier la transcription du génome viral. Le disulfirame permet la dégradation PTEN libérant Akt qui va activer la transcription virale. Les cytokines tels que l'IL7 permettent aussi la réactivation des génomes viraux latents *via* la voie Jack/Stat. Dans le noyau, le recrutement du complexe P-TEFb composé de CDK9, CycT1 par Tat permet le début de la transcription du génome viral. JQ1 libère pTEFb de Brd4 pour permettre la transcription. Les inhibiteurs d'HDAC, les HMT et DNMT permettent de décondenser la chromatine.

Un autre moyen d'activer l'expression virale est d'utiliser un modèle dérivé du système CRISPR-dCAS9 (« *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats-catalytically-deficient Cas9* »), (Mali et al., 2013). La protéine Cas9 a été modifiée (dCas9) dans ce système pour ne

plus avoir d'activité catalytique et pour s'associer à un ou plusieurs facteur(s) d'activation de la transcription (Gilbert et al., 2013). L'ARN CRISPR, capable de s'associer à la protéine dCas9 modifiée, est nommé dans ce système ARNsg et contient en outre une séquence complémentaire de l'ADN cible. Pour renforcer l'effet d'activation de transcription, il est possible de fixer sur dCas9 plusieurs facteurs de transcription par l'intermédiaire d'autres complexes protéiques (Koner mann et al., 2015; Tanenbaum et al., 2014). Pour activer la transcription du génome VIH-1, l'ARNsg est complémentaire d'une région du LTR. Ces techniques sont utilisées par transfection de plasmide codant pour les protéines du complexe comprenant dCas9 et pour l'ARNsg (Zhang et al., 2015).

Tous ces mécanismes multifactoriels (cf. **Figure 10**) sont nécessaires pour la réactivation de la latence (Darcis et al., 2017). Il existe une corrélation entre les réponses aux LRA et la taille du réservoir VIH-1. La combinaison de médicaments agissant en synergie pour diminuer le réservoir VIH-1 est encore en étude.

II.F. Induction de l'immunité cellulaire et humorale.

L'induction de l'expression des protéines virales ne suffit pas pour tuer toutes les cellules du réservoir VIH-1 car le cycle de réplication du VIH n'est pas toujours cytotolytique. Il est aussi nécessaire d'activer les LT cytotoxiques (LTc CD8⁺), les cellules NK et les LB. En effet, les anticorps produits par les LB permettent aux cellules NK de reconnaître les cellules infectées et de les tuer grâce à leur activité cytotoxique (Lee et al., 2015; Mujib et al., 2017a). Les cellules NK reconnaissent les complexes immuns formés par des antigènes fixés à des anticorps. Quant aux LTc CD8⁺, elles reconnaissent *via* leur TCR les cellules présentant un peptide viral sur le CMH de classe I et activent alors leur cytotoxicité envers les cellules présentatrices. L'activation des NK, des LB et de LT est donc nécessaire à l'élimination des cellules infectées. En outre, l'inhibition de Nef par des anticorps permet de lever l'inhibition de l'expression du CMH I par Nef et ainsi de renforcer la reconnaissance des cellules infectées par le TCR des LTc CD8⁺ (Mujib et al., 2017b). Pour la recherche de vaccins, des anticorps ont été isolés à partir de patients infectés. Des anticorps particuliers, reconnaissant différentes enveloppes du VIH-1, ont été découverts, ils sont dits à large spectre (Halper-Stromberg and Nussenzweig, 2016). En outre, certains de ces anticorps sont aussi neutralisants (bNAbs, « *broadly neutralizing antibodies*»), c'est-à-dire qu'en se fixant sur l'enveloppe, ils empêchent

sa fixation sur les récepteurs cellulaires (Chun et al., 2014; Halper-Stromberg et al., 2014; Jaworski et al., 2016; McCoy and Burton, 2017; Stamatatos et al., 2009). Des résistances à certains bNABs testés individuellement en clinique sont observées (Margolis et al., 2017). Utilisés en combinaison *in vitro*, ils semblent plus efficaces (Bruel et al., 2016). En effet ils ciblent différents épitopes de la glycoprotéine du VIH-1, à savoir principalement au niveau des boucles des régions variables V1, V2 et V3 de la gp120 ainsi qu'au niveau du site de liaison au récepteur CD4 (cf. **Figure 11**). Les anticorps non neutralisants jouent aussi un rôle important dans l'élimination des cellules infectées par le VIH-1. Ils sont notamment retrouvés dans le sérum des Elites Contrôleurs (Ackerman et al., 2016).

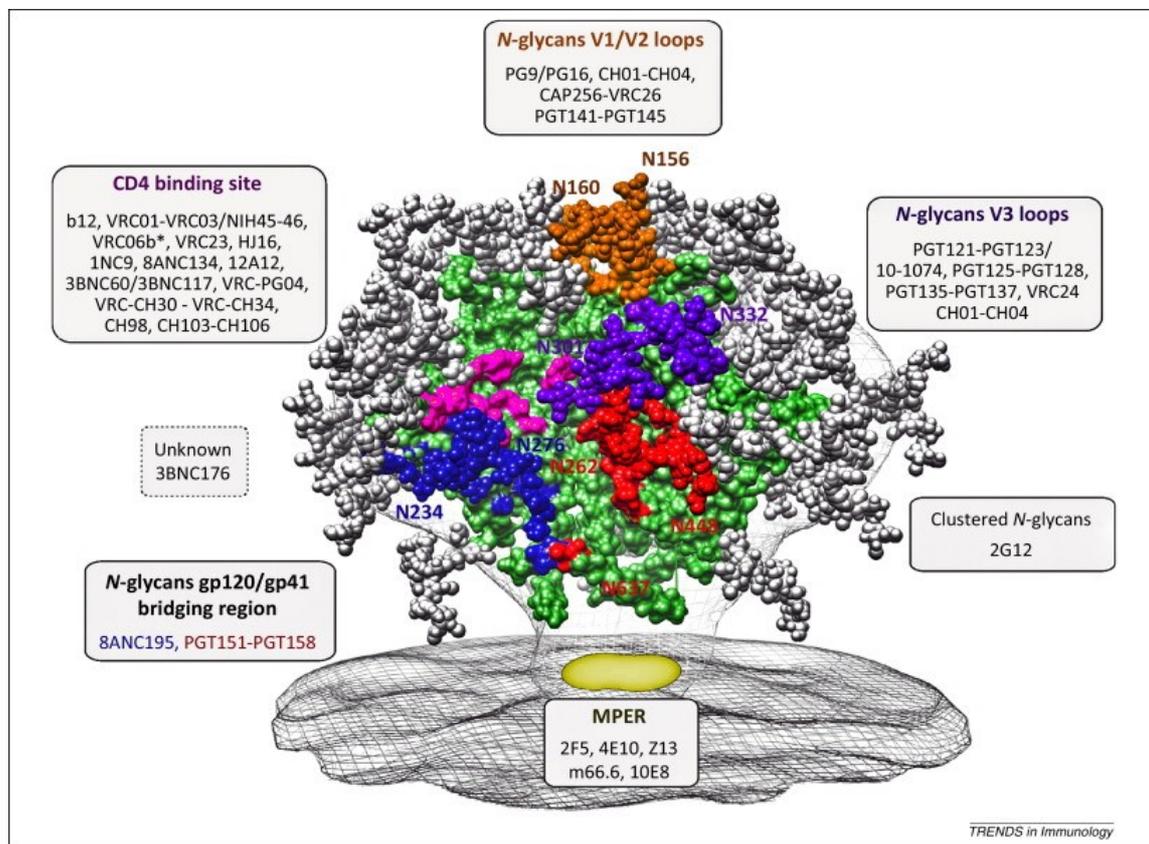


Figure 11. Anticorps neutralisant la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 (d'après Mouquet, 2014).

La structure cristalline de l'enveloppe est obtenue par reconstruction d'image de microscopie cryo-électronique (171,172, 173). La boucle V1-V2 de la gp120 est orange, la boucle V3 en violet, le site de liaison au CD4 en rose, les sites de liaison entre la gp41 et la gp120 en bleu et rouge, et la région MPER (« *membrane proximal external region* ») en jaune. Chaque bNAB est indiqué dans les encadrés correspondant aux différentes régions de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1. L'épitope VRC06b* reconnaît à la fois le site de liaison au CD4 et le site de liaison aux corécepteurs.

L'activation des LTc CD8+ est renforcée *in vivo* par l'action paracrine de cytokines. Ces dernières sont sécrétées par les LT CD4+ ayant reconnu *via* leur TCR un antigène. Plusieurs

équipes essayent d'améliorer la reconnaissance des antigènes du VIH-1 par le TCR (Patel et al., 2016), pour faire en sorte que ces lymphocytes envoient des signaux pour tuer la source de l'antigène, c'est-à-dire les cellules infectées. Il est possible de rediriger la reconnaissance des TCR vers des antigènes spécifiques *ex vivo*. Il est également possible d'utiliser un lentivirus pour faire exprimer, par ces LT, des récepteurs chimériques d'antigènes spécifiques (des CAR) (Zhen et al., 2017) déjà utilisés *in vivo* contre les cancers (Barrett et al., 2014). La partie extracellulaire des CAR est similaire au fragment variable des anticorps ou similaire à une molécule reconnaissant l'antigène cible (comme par exemple la molécule CD4 pour l'enveloppe VIH-1). Sa partie cytoplasmique est quant à elle similaire à celle d'un ou de plusieurs récepteurs membranaires tels que le CD3 et le CD28, permettant le passage de signaux intracellulaires. Des tests utilisant ces CARs chez des modèles murins humanisés (Varela-Rohena et al., 2008) et chez des singes (Ayala et al., 2016) ont montré une réduction de l'infection.

Pour diminuer la taille du réservoir VIH-1, il faut en plus d'un traitement avec des LRA, activer le système immunitaire dans son ensemble. Un des moyens est l'inhibition d'une protéine membranaire : PD-1 (Banga et al., 2016). La plupart des cellules immunitaires expriment PD-1. Or ce récepteur, en se fixant à son ligand PD-1L, induit une inhibition des activités immunitaires de la cellule. Ainsi, une inhibition de cette voie par l'utilisation d'anticorps se fixant à PD-1 permet de restaurer une immunité correcte (Patera et al., 2016). En effet, les lymphocytes B activés expriment à nouveau des anticorps neutralisants, les LTc CD8⁺ retrouvent leur activité cytotoxique et les LT CD4⁺ sécrètent à nouveau des cytokines activant les LTc CD8⁺ et les LB (Velu et al., 2015).

II.F.1. Contrôle du réservoir VIH-1 et inhibition de son expression

Une autre option est une guérison fonctionnelle par le maintien de la latence. L'induction d'une latence profonde se fait par une inhibition de la transcription virale. Pour cibler cette dernière, plusieurs possibilités sont envisageables. Tout d'abord, il est possible d'inhiber des facteurs d'activation de la transcription comme NF- κ B et pTEFb. Des quinoléines agissent sur la dégradation de I κ B et empêchent la ligature de NF- κ B sur l'ADN (Stevens et al., 2007; Tabarrini et al., 2008). D'autres molécules comme DHEMEQ bloquent sa translocation vers le noyau (Bedoya et al., 2010; Miyake et al., 2010; Osorio et al., 2012; Watanabe et al.,

2008; Yamamoto et al., 2008). Enfin, la molécule CYCLD stabilise I κ B donc inhibe NF- κ B qui reste alors bloqué dans le cytoplasme (Manganaro et al., 2014; Taura et al., 2015). Mais cibler NF- κ B n'est pas possible pour tous les sous-types du VIH-1. En effet, pour le sous-type E, les sites de liaison à NF- κ B sont remplacés par des sites de liaison au facteur de transcription GABP (Verhoef et al., 1999). De plus, il est compliqué d'agir sur ces facteurs dans les cellules cibles infectées sans affecter les autres cellules de l'organisme. D'autres molécules permettent aussi de cibler la protéine pTEFb, soit en inhibant son interaction avec Tat, soit en inhibant son activité kinase impliquée dans l'élongation de la transcription (Mousseau et al., 2015a; Sancineto et al., 2013). En outre, pour inhiber la transcription, l'interaction entre Tat et TAR peut aussi être contrecarrée (Tiefendbrunn and Stout, 2014). Par exemple, la protéine p300 inhibe l'acétylation de Tat qui reste alors inactive (Lin et al., 2011). Un autre exemple est la triptolide qui adresse Tat au protéasome (Wan and Chen, 2014). De plus, la didehydrocortistatine, venant d'une éponge marine est assez prometteuse, car non seulement elle inhibe la transcription en se fixant à TAR à la place de Tat mais aussi elle empêche l'action des LRA sur les LT CD4⁺ quiescents *ex vivo* comme si elle verrouillait le système d'activation (Aoki et al., 2006; Mousseau et al., 2015b). Cette molécule permettrait vraiment l'installation d'une latence profonde.

Des phosphatases de la famille des protéines DING inhibent aussi l'action des facteurs de transcription. (Cherrier et al., 2011; Djeghader et al., 2013; Lesner et al., 2009; Sachdeva et al., 2015). Par exemple, la protéine p27^{SJ} (St. John's Wort) agit de trois manières différentes pour inhiber la transcription virale : elle interagit avec la protéine Tat afin de la délocaliser du noyau vers le cytoplasme, elle empêche la fixation du facteur de transcription C/EBP β sur la région modulatrice du LTR et elle déphosphoryle le domaine carboxy-terminal de la polymérase II, l'inhibant (Darbinian et al., 2011; Darbinian-Sarkissian et al., 2006).

Par ailleurs, en amont de la transcription, il est également possible d'agir pour limiter l'expression du réservoir viral. Des ARN interférents (ARNi) dirigés contre les ARNm viraux permettent leur dégradation (Chung et al., 2014; Méndez et al., 2015). Quant à la protéine Rev qui permet l'export des ARNm viraux non épissés, elle peut être inhibée par ABX464 (Campos et al., 2015). Or si l'export des ARN non épissés est bloqué, alors les protéines virales Gag et Pol ne peuvent être exprimées, bloquant le cycle de réplication du VIH-1. Cette molécule pourrait être une alternative aux antirétroviraux actuels car elle n'est pas toxique pour les PBMC *ex vivo*, en effet elle ne perturbe pas l'export des ARNm cellulaires.

II.F.2.Eradication du virus par thérapie génique

Etant donné que la réactivation des cellules du réservoir VIH-1 nécessite aussi une réponse immunitaire simultanée compliquée à mettre en place, d'autres méthodes plus radicales pour limiter l'infection et éliminer le virus utilisant le système CRISPR-Cas9 se sont aussi développées.

Par exemple, suite à la guérison du patient de Berlin, une mutation du récepteur CCR5 a été mise en évidence car celle-ci procure aux porteurs homozygotes une résistance au virus R5 tropique (Biti et al., 1997; Hütter and Thiel, 2011). Mais moins d'1% des caucasiens porteraient cette mutation, et étant donné la complexité des dons de moelle osseuse, cette option n'est pas envisageable pour les millions de personnes infectées dans le monde (Samson et al., 1996). Le système CRISPR-Cas9 permet d'exciser ou de muter le gène codant CCR5 dans des LT CD4⁺ *ex vivo* par transfection et transduction (Cho et al., 2013; Wang et al., 2014; Ye et al., 2014). Cependant, pour le moment, les ARNsg utilisés ne cibleraient pas seulement le gène CCR5 mais aussi celui juste à côté codant CCR2 qui est vital pour les cellules. En outre, les cellules ne supporteraient pas la présence d'ADN étranger (Cho et al., 2014; Cradick et al., 2013; Monroe et al., 2014). De nouvelles recherches avec deux ARNsg utilisés simultanément pour déléter le gène CCR5 sembleraient plus fructueuses *ex vivo* et *in vivo* dans un modèle murin humanisé. Cependant ces techniques ne peuvent s'appliquer qu'au virus R5 tropique (Mandal et al., 2014).

Le moyen le plus radical pour éliminer le réservoir viral sans tuer les cellules du système immunitaire est d'utiliser le système CRISPR-Cas9 pour exciser les génomes viraux intégrés. Différentes cibles sont possibles : soit le génome entier avec des ARNsg complémentaires des séquences U3 du LTR, soit les ORF des protéines virales (Ebina et al., 2013; Liao et al., 2015). A contrario, les mutations peuvent être introduites dans un gène intéressant pour maintenir la latence, c'est-à-dire un gène ne codant pas une protéine mais un ARN long, non codant, (ARNlnc) qui, en se fixant sur le LTR, permet une activation de la transcription (Kobayashi-Ishihara et al., 2012; Landry et al., 2007; Ludwig et al., 2006; Saayman et al., 2014). Or, chez les Elites Controllers, ce gène n'est pas intact (Kirchhoff et al., 1995). Ainsi, en ciblant cet ARNlnc par CRISPR-Cas9, il serait possible de maintenir la latence dans un stade profond. La combinaison de ces deux dernières techniques pourrait permettre une éradication du virus de l'organisme humain.

III. Glycoprotéine d'enveloppe

III.A. Gène de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1

Le gène codant pour l'enveloppe du virus est le deuxième plus long du génome viral après celui de la polymérase (cf. **Figure 6**). Tout le long de sa séquence nucléotidique, certaines parties sont plus conservées que d'autres. Les régions variables diffèrent par leur taille et leur composition selon les virus (V1 à V5, cf. **Figure 12**). Or le gène de l'enveloppe étant long de 2575 paires de bases en moyenne, de nombreux changements l'affectent à chaque transcription inverse. Plus le patient a été traité tôt, plus la variabilité des séquences génomiques de l'enveloppe du réservoir VIH-1 est restreinte (Josefsson et al., 2013). En effet, cette observation est logique car plus la réplication virale est permise longtemps, plus de nombreuses quasi-espèces virales, avec des mutations apparaissant dans le gène *env*, émergeront sous la pression du système immunitaire. Ainsi, plus la variabilité des quasi-espèces est importante avant la mise sous traitement, plus celle de séquences du réservoir le sera aussi.

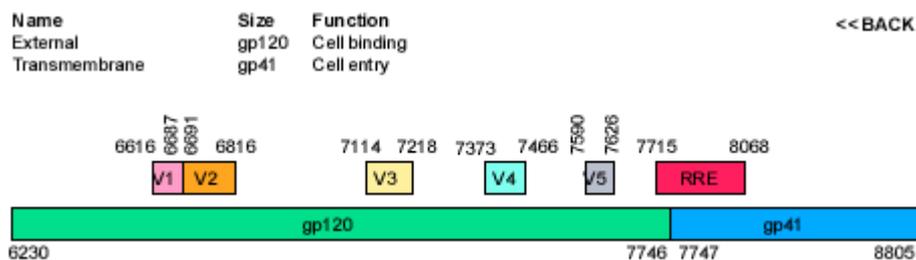


Figure 12. Gène de l'enveloppe du VIH-1 (d'après Los Alamos HIV LAB).

Le gène *env* code pour deux glycoprotéines d'enveloppe : la gp120 et la gp41. Le gène *env* mesure 2575pb en moyenne. En effet, certaines régions sont de longueur et de composition nucléotidique particulièrement variables au sein du segment codant la gp120. Au sein de la gp41, le segment RRE (« *Rev response element* ») permet l'export de l'ARNm codant l'enveloppe du noyau vers le cytoplasme.

III.B. Expression et Maturation

A partir du génome viral, un ARN mono-épissé *env-vpu* est transcrit (Freed and Martin, 1995; Hunter and Swanstrom, 1990). Grâce à sa séquence N-terminale d'adressage, il est dirigé vers le réticulum endoplasmique rugueux (RER) pour la traduction. Suite à la traduction,

un domaine hydrophobe situé dans la gp41 sert d'ancre membranaire, maintenant la gp160 dans la lumière du RER (Haffar et al., 1988). Dans la lumière de l'appareil de Golgi, s'effectue alors la N-glycosylation et la O-glycosylation induisant une conformation tertiaire (Allan et al., 1985; Doms et al., 1991; Earl et al., 1991). Trois gp160 s'oligomérisent en trimère (Doms et al., 1991; Earl et al., 1990, 1991; Pinter et al., 1989), puis la gp160 est clivée au niveau de son motif K/R-X-K/R-R en deux protéines, la gp120 et la gp41, par une protéase furine cellulaire dans l'appareil de Golgi (Freed et al., 1989; McCune et al., 1988). Tout au long de ce processus se forment des ponts disulfures entre des cystéines et des liaisons non covalentes (Leonard et al., 1990), permettant la formation de trimères d'hétéro-dimères nommés spicules (**Figure 13**).

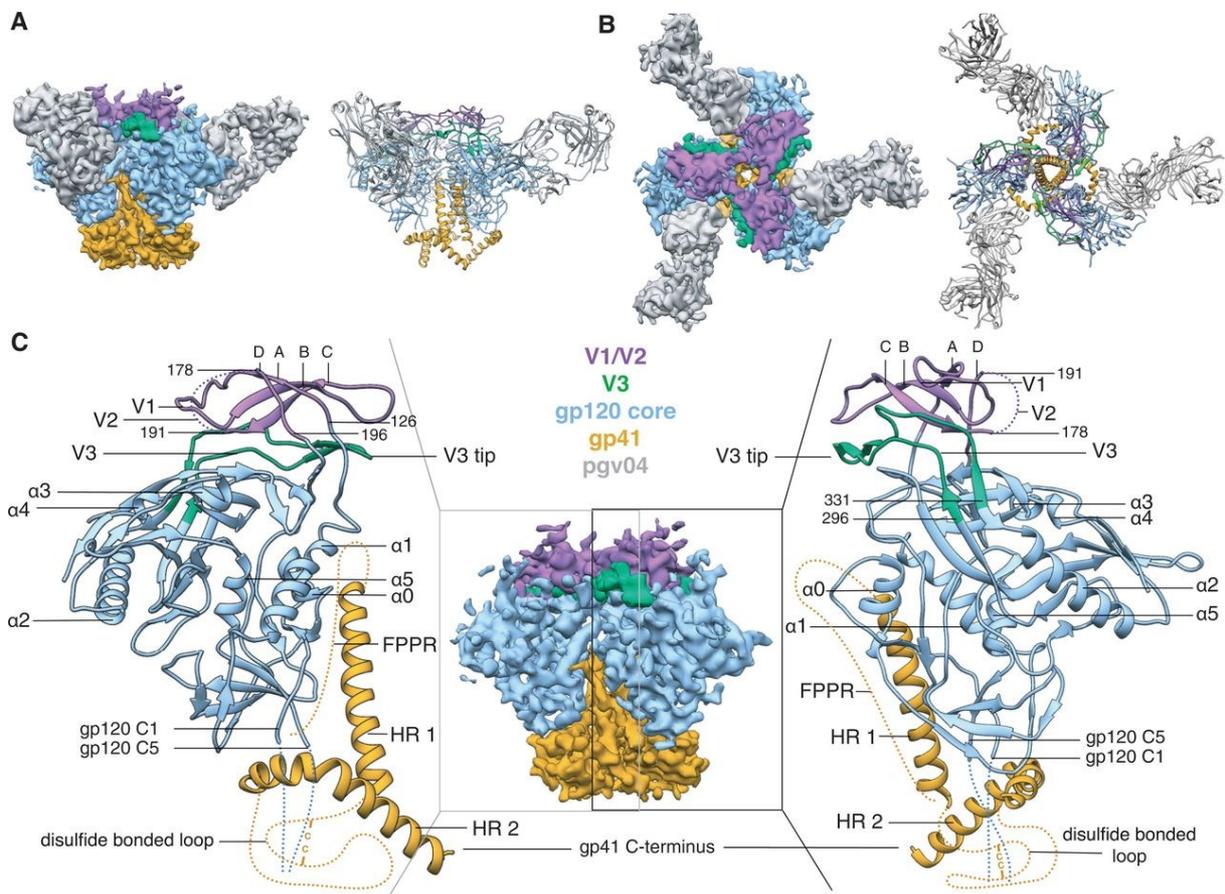
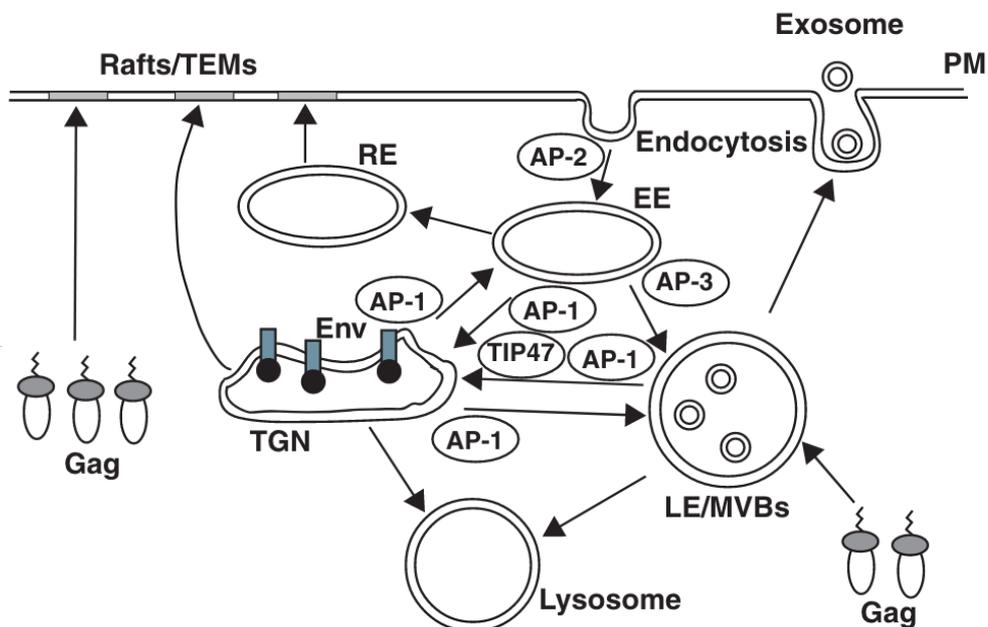


Figure 13. Structure du trimère de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 (d'après Lyumkis et al., 2013).

A. Trimère de l'hétérodimère de la glycoprotéine d'enveloppe complexé avec un bNAbs nommé PGV04 se fixant au site de liaison du CD4, vu de côté. La gp120 est représentée en bleu et violet, la gp41 en orange, et PGV04 en gris. **B.** Même complexe, vu du dessus. **C.** Vue du trimère seul de côté avec les hélices α , les ponts disulfures, les régions variables et constantes de la gp120 et les domaines HR de la gp41 qui sont indiqués par des flèches.

Ensuite, l'enveloppe est dirigée vers des endosomes puis vers la membrane plasmique. Ce mouvement antérograde est en général suivi d'un mouvement rétrograde pour éviter que l'enveloppe ne reste trop longtemps à la membrane plasmique et limiter ainsi sa détection par le système immunitaire (Lebigot et al., 2001). Les enveloppes se fixent à des adaptines (AP) pour être transportées dans les vésicules à clathrine (**Figure 14**). Elles interagissent avec la chaîne μ d'AP-1 pour aller vers les endosomes tardifs à partir de l'appareil de Golgi par leur motif YXX Φ (Y pour Tyrosine, X pour acide aminé quelconque, Φ pour acide aminé hydrophobe) situé dans la région cytoplasmique de la gp41 (Berlioz-Torrent et al., 1999; Egan et al., 1996; Kyttälä et al., 2005; LaBranche et al., 1995; Ohno et al., 1997; Theos et al., 2005; Wyss et al., 2001). Les enveloppes se fixent par ce même motif également à AP-2 pour être internalisées depuis la membrane plasmique vers un endosome (Boge et al., 1998; Ohno et al., 1997; Nakatsu and Ohno, 2003). De plus, les enveloppes pourraient aussi être dirigées vers les lysosomes *via* AP-3 (Ihrke et al., 2004; Rous et al., 2002). En outre, comme l'enveloppe est cytopathogène pour la cellule qui l'exprime à sa surface (cf. III.E)(Sodroski et al., 1991), son internalisation pour recyclage permet de maintenir la cellule en vie (Byland et al., 2007).



© 2008 The Societies and Blackwell Publishing Asia Pty Ltd

Figure 14. Adressage antérograde et rétrograde des protéines d'enveloppe (Env) et des protéines Gag du VIH-1 dans la cellule infectée (d'après Murakami, 2008).

L'adaptine AP-2 permet d'internaliser des protéines par endocytose ; AP-1 permet aux protéines qui s'y fixent d'être transportées de l'appareil de Golgi (TGN, « *trans Golgi network* ») vers les endosomes et vice-versa ; les protéines qui fixent AP-3 sont dirigées vers les lysosomes.

III.C. Structure et domaines

III.C.1. La glycoprotéine 120

La glycoprotéine 120 (gp120) est une protéine de 120KDa, d'environ 500 acides aminés, hautement glycosylée. Elle comporte 5 régions conservées (C1 à C5) et 5 régions variables (V1 à V5) (Starcich et al., 1986; Willey et al., 1986; Wyatt and Sodroski, 1998, **Figure 15**). Les boucles V1 et V3 sont particulièrement variables au niveau de leur longueur, de leur séquence nucléotidique et de leur glycosylation (Chohan et al., 2005; Curlin et al., 2010; Kitrinou et al., 2003; Masciotra et al., 2002; Palmer et al., 1996; Sagar et al., 2006; Shioda et al., 1997). V3 est impliquée dans différents processus : la liaison aux corécepteurs (Cann et al., 1992; Chesebro et al., 1991; Hwang et al., 1991; O'Brien et al., 1990; Shioda et al., 1991), le tropisme du virus (Fouchier et al., 1992; Pollakis et al., 2004; Shioda et al., 1994) et la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique (Freed et al., 1991). En outre V3 est reconnue par des anticorps neutralisants (Goudsmit et al., 1988; Matsushita et al., 1988; Palker et al., 1988; Rusche et al., 1988). Les régions conservées C1, C3 et C4 permettent la liaison de l'enveloppe sur le récepteur CD4 (Kowalski et al., 1987; Lasky et al., 1987; Olshevsky et al., 1990). Quant à C1 et C5, elles sont nécessaires à la gp120 pour interagir avec la gp41 (Cao et al., 1993). Des images par cristallographie permettent de visualiser les domaines importants pour la liaison aux récepteurs, aux corécepteurs et aux anticorps (Huang et al., 2005; Kwong et al., 1998; Pancera et al., 2010; Zhou et al., 2007) ainsi que des images par Cryomicroscopie électronique (Wu et al., 2010). Ces images permettent de visualiser le changement de conformation après liaison au CD4 favorisant la liaison aux corécepteurs (Checkley et al., 2011).

III.C.2. La glycoprotéine 41

La glycoprotéine 41 (gp41) est une protéine de 41KDa, d'environ 345 acides aminés. Elle possède trois domaines : un domaine extracellulaire en position N-terminale (EC), un domaine transmembranaire (TM) et un domaine cytoplasmique en C-terminale (DC) (**Figure 15**).

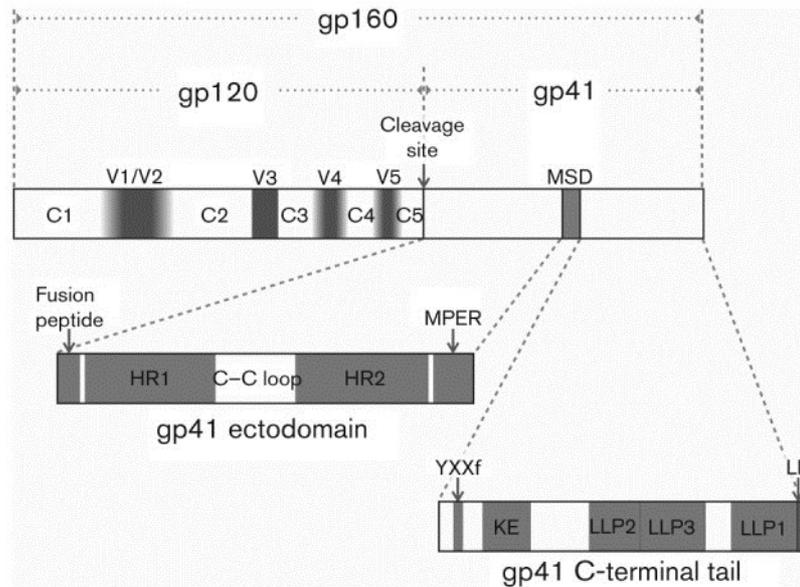


Figure 15. Domaines et motifs des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 (d'après Steckbeck et al., 2013).

La glycoprotéine gp160 est clivée en deux protéines : la gp120 et la gp41. Les régions variables de la gp120 sont en gris et les régions constantes en blanc. Les régions heptamériques HR1 et HR2, le peptide de fusion, et le motif MPER (« membrane-proximal external region ») sont indiqués sur la partie N-terminale extracellulaire de la gp41. Les motifs LLP (« *Lentivirus Lytic Peptide* »), le motif YXXΦ, et l'épitope Kennedy (KE) d'anticorps neutralisants (Kennedy et al., 1986) sont représentés sur la partie cytoplasmique C-terminale de la gp41.

Dans l'EC, un peptide de fusion hydrophobe en N-terminale est libéré lorsque la gp120 se lie au récepteur et au corécepteur (Bosch et al., 1989; Freed et al., 1990; Kamath and Wong, 2002; Wong, 2003). Deux régions heptamériques (HR1 et HR2) à hélices α de l'EC confèrent une structure hélicoïdale au domaine : 3 C-hélices proximales et 3 N-hélices distales se font face de manière parallèle (Chan et al., 1997; Dubay et al., 1992a, 1992b; Lu et al., 1995; Melikyan et al., 2000; Tan et al., 1997; Weissenhorn et al., 1997). La libération de cette structure permet un rapprochement des membranes et une libération d'énergie. Des mutations au sein du domaine HR1 de la gp41 bloquent la fusion entre les feuillettes externes des membranes, appelée hémifusion, et la fusion complète (Lay et al., 2011). En outre, l'EC possède une région riche en tryptophane proche du domaine TM (MPER, « *membrane-proximal external region* ») nécessaire à la fusogénicité de l'enveloppe et donc à l'infectivité du virus (Muñoz-Barroso et al., 1999; Pountourios et al., 1995; Salzwedel et al., 1999). De plus, cette région étant hautement conservée, elle est reconnue par des anticorps neutralisants (Cao et al., 1993; Zwick et al., 2001).

Le domaine TM de la gp41 est conservé et très hydrophobe, permettant un ancrage dans les membranes lipidiques. Bien que ne comportant que 25 acides aminés, elle est

essentielle. En effet, si elle est mutée, le processus de fusion est inhibé (Kondo et al., 2010; Miyauchi et al., 2005; Shang and Hunter, 2010; Shang et al., 2008; Welman et al., 2007).

Le domaine cytoplasmique est impliqué dans de très nombreuses fonctions étant donné sa proximité avec les protéines cellulaires intra-cytoplasmiques. Par exemple, ce domaine est essentiel pour les mouvements rétrogrades et antérogrades de l'enveloppe. En effet, en position 855/856, deux leucines sont nécessaires à la fixation de l'Env sur l'AP-1 (Berlioz-Torrent et al., 1999; Ohno et al., 1997; Wyss et al., 2001) et en position 712, une tyrosine permet la fixation non seulement sur la région $\mu 2$ de l'AP-2 (Boge et al., 1998) mais aussi sur celle d'AP-1 (Berlioz-Torrent et al., 1999). De plus, un motif di-aromatique Y₈₀₂W₈₀₃, interagissant avec la protéine cellulaire TIP47, présente sur les endosomes, permet un transport rétrograde de l'enveloppe (Blot et al., 2003; Lopez-Vergès et al., 2006). En outre, en position C-terminale de la gp41, se trouvent trois motifs conservés LLP (« *Lentivirus Lytic Peptide* ») essentiels. S'ils sont tronqués alors la réplication virale n'est plus complète (Day et al., 2004; Dubay et al., 1992b; Iwatani et al., 2001; Piller et al., 2000; Shacklett et al., 2000). En effet, ces motifs sont nécessaires à la multimérisation de l'enveloppe (Lee et al., 2000), à sa stabilité (Lee et al., 2002), à son adressage au niveau de radeaux lipidiques (Roussio et al., 2000; Yang et al., 2010), à son incorporation au sein des virions (Akari et al., 2000; Cosson, 1996; Gabuzda et al., 1992; Murakami and Freed, 2000; Piller et al., 2000) et à la fusion membranaire (Kalia et al., 2003).

III.D. Interaction avec CD4 et CCR5/CXCR4 et fusion

Deux cas sont possibles, soit l'enveloppe est incorporée dans un virion, soit elle reste exposée au niveau de la membrane plasmique de la cellule infectée. Dans les deux cas, après la reconnaissance de CD4, la gp120 change de conformation permettant l'exposition de la boucle V3 de la gp120 (Hongjaisee et al., 2017). Puis suite à la fixation sur un des deux corécepteurs par cette boucle V3, le peptide de fusion de la gp41 est libéré et s'insère dans la membrane plasmique de la cellule cible. Cette insertion perturbe la membrane, qui change alors de structuration, permettant le rapprochement des deux membranes (**Figure 16**). Le feuillet lipidique externe de l'enveloppe virale fusionne avec celui de la membrane plasmique, c'est le processus d'hémifusion (Blumenthal et al., 2003; Chernomordik and Kozlov, 2005). Puis un pore de fusion va se former libérant la capsid virale dans le cytoplasme. L'hémifusion

peut s'effectuer entre deux membranes plasmiques si les protéines d'enveloppe sont juste exprimées à la surface et non incorporées dans un virion. Dans ce cas, un syncytium entre les deux cellules peut se former, provoquant la formation de cellules multi-nucléées, souvent suivi par l'apoptose de ces dernières (Lifson et al., 1986; Sodroski et al., 1986). Ce processus est peu observé *ex vivo* sur des cellules du sang mais est très bien caractérisé *in vitro* (Anderson, 2000; LaBonte et al., 2000). La formation de syncytia a été remarquée *ex vivo* chez certains types cellulaires du cerveau, et serait un des processus à l'origine de l'inflammation affectant le SNC de certains patients (Fais et al., 1997; Nardacci et al., 2005). Par ailleurs, dans le cas où la fusion n'est pas complète et s'arrête à l'hémifusion, cette dernière est suffisante pour provoquer l'apoptose des cellules impliquées (Bär and Alizon, 2004; Blanco et al., 2003; Garg and Blumenthal, 2008). La partie extracellulaire et la région transmembranaire de la gp41 sont nécessaires à la fusion et à la formation de syncytia (Ashkenazi et al., 2011; Bär and Alizon, 2004; Bergeron et al., 1992; Helseth et al., 1990; Kowalski et al., 1991; Lay et al., 2011). Des études intéressantes ont montré que la troncation de la partie cytoplasmique de la gp41 renforce étrangement la formation de syncytia (Gabuzda et al., 1992; Wilk et al., 1992). A *contrario*, des mutations dans ce domaine au niveau des motifs LLP inhibent le processus de fusion (Kalia et al., 2003).

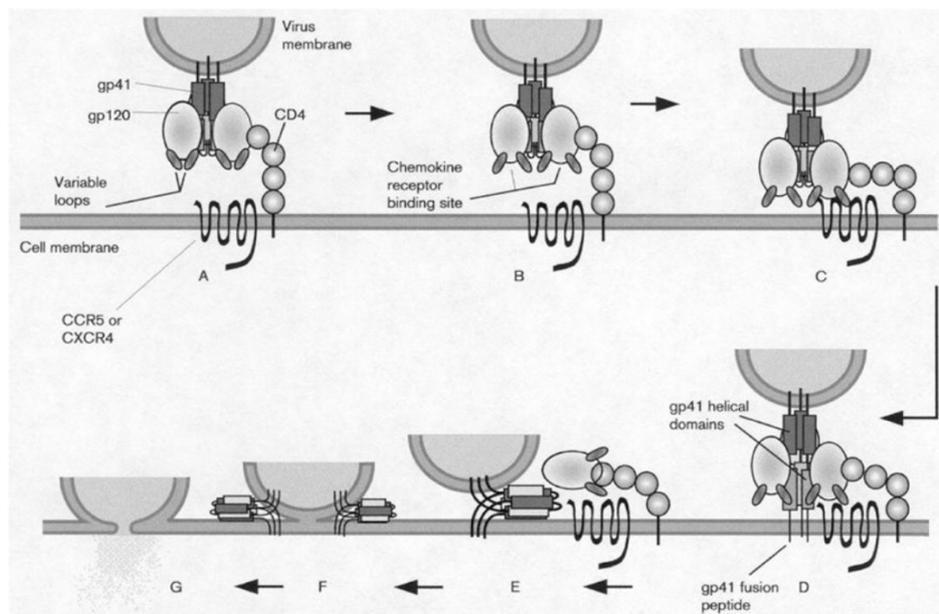


Figure 16. Entrée du VIH (Starr-Spires and Collman, 2002).

A. Fixation de la gp120 sur le récepteur membranaire CD4 **B.** Changement de conformation de la gp120 libérant le site de fixation au corécepteur. **C.** Fixation au corécepteur CCR5 ou CXCR4. Changement de conformation de l'enveloppe, libération du peptide de fusion. **D.** Insertion du peptide de fusion de la gp41 au sein de la membrane plasmique. Début de formation d'épingle à cheveux avec les hélices α **E.** Changement de conformation de la gp41, formation de faisceaux d'épingles à cheveux avec les hélices α et rapprochement des domaines C et N-terminaux de la gp41 puis des membranes lipidiques **F.** Hémifusion. **G.** Fusion totale et formation d'un pore.

III.E. L'enveloppe, un agent cytopathogène

La déplétion des lymphocytes T CD4⁺ et la dégénérescence du SNC sont associées à différentes fonctions cytopathogènes de l'enveloppe virale. La mort cellulaire induite par l'enveloppe peut être déclenchée dans la cellule infectée, ou dans une cellule avoisinante (Lelièvre et al., 2004), ou encore par formation de syncytium entre une cellule infectée et une cellule non infectée (Perfettini et al., 2005, **Figure 17**). Des études montrent que la gp120 soluble peut induire l'apoptose non seulement de lymphocytes (Cicala et al., 2000), mais aussi de neurones (Catani et al., 2000; Garden et al., 2004; Hayward, 2004; Xu et al., 2004), de cardiomyocytes (Barbaro et al., 2001; Twu et al., 2002), de cellules épithéliales du rein (Kapasi et al., 2002; Ray et al., 2003) et d'hépatocytes (Vlahakis et al., 2003). L'enveloppe modifie la structuration de la membrane lors de l'entrée virale ainsi que lors de l'expression de l'enveloppe néo-synthétisée. Dans ce deuxième cas, l'enveloppe exprimée par les cellules infectées perturbe l'intégrité, la perméabilité et la conductance de la membrane plasmique (Comardelle et al., 1997; Miller et al., 1993a). La perturbation de la membrane plasmique est renforcée par la formation de pores par les domaines LLP de l'enveloppe agissant comme des « viroporines » et laissant passer des molécules de petites tailles (MW527/696) (Chernomordik et al., 1994; Gatti et al., 1998; Gawrisch et al., 1993; Miller et al., 1993a; Srinivas et al., 1992; Tencza et al., 1997; Venable et al., 1989). L'oligomérisation des enveloppes virales nécessaire à la formation de pores est permise par l'environnement lipidique de la membrane (Costin, 2007; Marion et al., 1988; Murzyn and Pasenkiewicz-Gierula, 2003; Yang et al., 2001). Comme les membranes sont perturbées, les concentrations ioniques intracellulaires le sont aussi provoquant une activation des voies apoptotiques (Choi et al., 1998; Haughey and Mattson, 2002; Makutonina et al., 1996; Voss et al., 1996a, 1996b). De plus, l'expression de l'enveloppe au niveau de la membrane plasmique provoque à long terme l'inhibition de la calmoduline *via* ses motifs LLP conduisant à l'apoptose des cellules (Beary et al., 1998; Miller et al., 1993b; Tencza et al., 1997). Toujours dans ce deuxième cas, l'enveloppe peut provoquer la vacuolisation du réticulum endoplasmique (Fermin and Garry, 1992; Plymale et al., 1999) et une auto-fusion si les récepteurs membranaires CD4 sont exprimés dans les vacuoles intracellulaires contenant l'enveloppe, induisant une nécrose (Cao et al., 1996, **Figure 18**).

En outre, l'interaction entre les récepteurs CD4, CXCR4/CCR5 et l'enveloppe induit aussi l'activation des voies intrinsèques de l'apoptose, impliquant les caspases (Berndt et al., 1998;

Blanco et al., 1999, 2004; Roggero et al., 2001, **Figure 18**). Les caspases sont des protéases qui clivent les protéines nécessaires au maintien de l'intégrité de la cellule, comme les protéines de structure. Ces activations pro-apoptotiques ayant lieu suite à l'interaction de la gp41 avec ses récepteurs, le stade d'hémifusion induit à lui seul l'apoptose de la cellule cible (Bär and Alizon, 2004; Blanco et al., 2003).

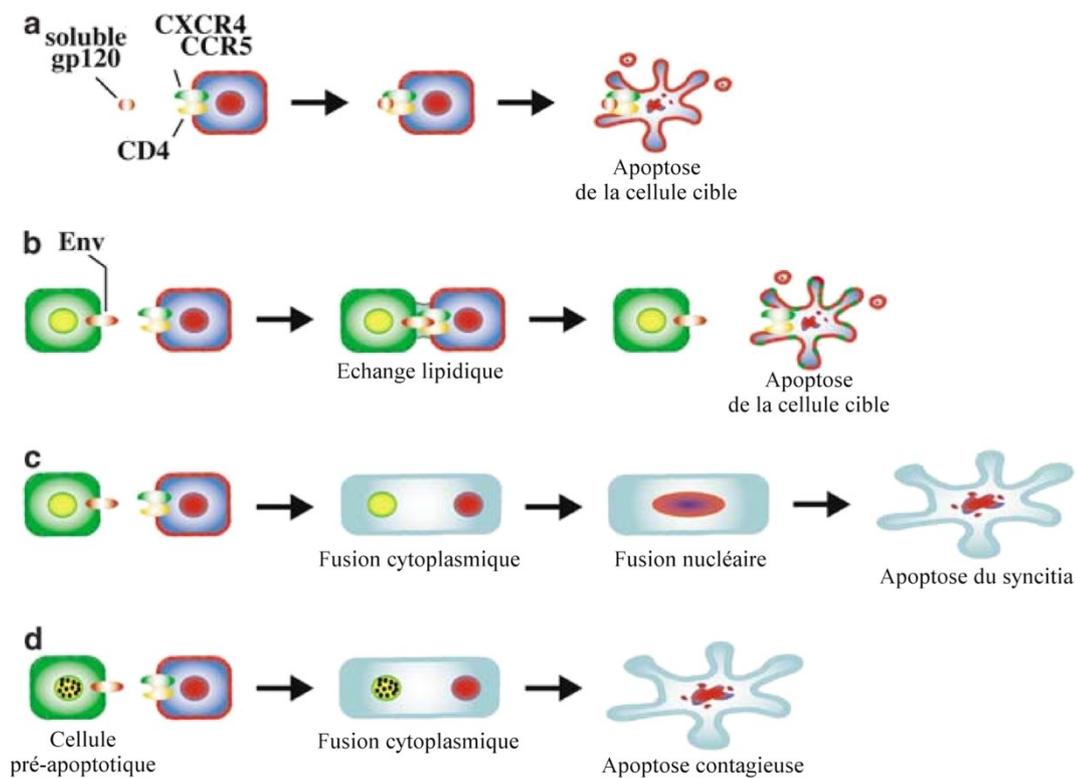


Figure 17. Mécanismes de pathogénèse causés par la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 (d'après Perfettini et al., 2005).

(a) Mort d'une cellule suite à l'entrée du VIH-1 *via* l'interaction entre la gp120 et les récepteurs. (b) déclenchement d'apoptose après échange de lipides lors d'une hémifusion induite par l'enveloppe du VIH-1. (c) Apoptose suite à la formation d'un syncytium entre une cellule exprimant l'enveloppe du VIH-1 et une cellule exprimant les récepteurs CD4 et CCR5/CXCR4. (d) Apoptose contagieuse suite à la formation d'un syncytium entre une cellule en apoptose exprimant l'enveloppe du VIH-1 et une cellule exprimant les récepteurs CD4 et CCR5/CXCR4.

Ensuite, si la fusion est complète avec caryogamie, d'autres protéines pro-apoptotiques vont être activées en cascade, activant finalement aussi les caspases (Ferri et al., 2000a, 2000b; Perfettini et al., 2005). Les premières protéines mises en jeu sont la p38 et cdk1B qui activent à leur tour la protéine mTOR qui phosphoryle p53 (Castedo et al., 2001, 2002; Kaul and Lipton, 1999; Muthumani et al., 2004). p53 phosphorylée active la voie mitochondriale pro-apoptotique, impliquant notamment les protéines Bax et Bak. Ces deux dernières activées conduisent à la libération de cytochromes C qui une fois dans le cytoplasme

activent les caspases (Perfettini et al., 2004, 2005; Petit et al., 2002). D'après une étude *in vitro*, p53 est phosphorylée 24h post-infection et les caspases sont activées 48h post-infection (Genini et al., 2001). L'induction de l'apoptose n'est donc pas immédiate, laissant le virus se répliquer entre temps, et laissant le temps à la cellule de fusionner avec une autre cellule. Une cellule infectée en apoptose exprimant l'enveloppe peut fusionner avec une autre cellule. Dans ce cas, elle propage son état apoptotique car une fois que les mécanismes de formation de chromatine pré-apoptotique sont mis en place, aucun retour n'est possible pour les deux cellules : on parle alors d'apoptose contagieuse (Andreau et al., 2004a, 2004b; Blanco et al., 2004, **Figure 17**). D'autres voies de l'apoptose, non pas intrinsèques mais extrinsèques, provoquent la mort des cellules voisines de celles exprimant l'enveloppe du VIH-1. Ces voies impliquent le ligand du récepteur de mort Fas (FasL) qui est exprimé suite à l'interaction de l'enveloppe avec le CD4 de la cellule voisine (Hashimoto et al., 1997; Somma et al., 2000; Tateyama et al., 2000). Ces phénomènes seraient liés à la mort des macrophages et des cardiomyocytes observés chez certains patients, infectés par le VIH-1, développant des cardiomyopathies (Twu et al., 2002). En outre, comme la gp120 possède au niveau de sa boucle V3 un motif VEINCTR identique à celui de Fas, les anticorps dirigés contre ce motif imite FasL et provoque la mort des cellules exprimant Fas (Silvestris et al., 1996).

Au niveau du cerveau, des taux importants de molécules pro-apoptotiques, comme le glutamate (Bubien et al., 1995; Kort, 1998) et la protéine p53 phosphorylée donc active, sont retrouvés dans les autopsies des patients atteints d'encéphalites et d'autres troubles neuronaux (Castedo et al., 2001, 2002; Garden et al., 2004; Genini et al., 2001; Jordan-Sciutto et al., 2000; Perfettini et al., 2004; Silva et al., 2003). La formation de syncytia est surtout retrouvée au niveau du cerveau (Cloyd and Lynn, 1991; Silva et al., 2003; Takeya et al., 1991; Vago et al., 1993). Les virus de tropisme CXCR4 semblent se développer lors du stade SIDA et être responsables de plus d'évènements apoptotiques que ses homologues CCR5, suite à la formation de syncytia (Philpott, 2003). La déplétion de lymphocytes est corrélée à la formation de syncytia (Camerini et al., 2000; Etemad-Moghadam et al., 2000; Scheller and Jassoy, 2001; Sylwester et al., 1997) et à une orientation vers un tropisme CXCR4 (Bleul et al., 1997; Holm et al., 2004; Miedema et al., 1994).

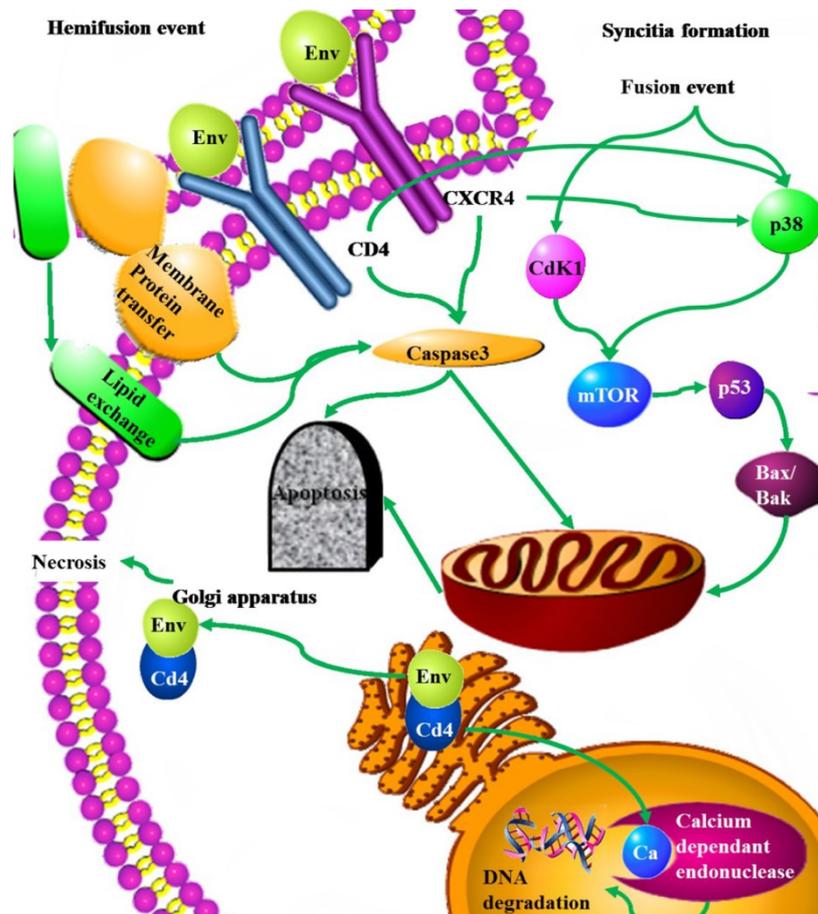


Figure 18. Mécanismes de l'enveloppe du VIH-1 induisant l'apoptose (d'après Mbita et al., 2014).

L'hémifusion provoque des échanges de lipides et de protéines entre la membrane exprimant l'enveloppe et la membrane exprimant les récepteurs et les corécepteurs. Ces échanges perturbent l'intégrité de la membrane plasmique qui envoie alors des signaux pro-apoptotiques *via* l'activation de la caspase 3. Si l'enveloppe induit une fusion complète des membranes, la formation d'un syncytia va provoquer d'autres signaux pro-apoptotiques intrinsèques *via* notamment les protéines Cdk1, p38, mTOR, p53 et les protéines de la famille de Bax /Bak. En outre, la fixation de l'enveloppe néosynthétisée sur un récepteur CD4 en intra-cellulaire, notamment au niveau du RER, induit des signaux de nécrose.

Objectifs

Malgré le développement des LRA, le réservoir VIH-1 reste un frein pour l'éradication du VIH. L'étude des virus émergeant de ce réservoir est donc toujours d'actualité. Les caractéristiques des protéines virales du réservoir VIH-1 des LT CD4⁺ sont mal décrites à ce jour. Étant donné que l'enveloppe est cytopathogène et immunogène, l'étude de son expression et de sa fonctionnalité est cruciale pour comprendre les mécanismes à induire pour éliminer le réservoir VIH-1. Le but de ce travail de thèse est donc de caractériser l'expression et la fonctionnalité des protéines d'enveloppes du réservoir VIH-1 d'individus traités par des antirétroviraux afin de mieux pouvoir les cibler, en vue d'une guérison qu'elle soit totale ou fonctionnelle. Ce travail de thèse s'articule autour de deux points principaux.

Pour les stratégies actuelles visant à éliminer le réservoir VIH-1 par réactivation des cellules quiescentes, l'enveloppe par son pouvoir cytopathogène et immunogène joue un rôle crucial. En effet, selon le niveau d'expression des enveloppes du réservoir VIH-1 après réactivation, les TCR des lymphocytes T et les anticorps produits par les lymphocytes B vont plus ou moins bien pouvoir se fixer sur les épitopes de cette protéine virale. La fixation des TCR des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques sur les peptides dérivés de l'enveloppe permet l'élimination des cellules du réservoir VIH-1. De même, la fixation des anticorps sur les antigènes de l'enveloppe virale permet également la destruction de ces cellules par ADCC. De plus, par son pouvoir cytopathogène, l'expression des glycoprotéines d'enveloppe et la fusion qu'elle permet avec les lymphocytes avoisinants provoquent l'apoptose de la cellule du réservoir VIH-1. La constitution en acides aminés de la glycoprotéine d'enveloppe, sa conformation, sa stabilité, son expression et sa fonctionnalité sont ainsi des facteurs importants à décrire pour connaître les obstacles potentiels aux stratégies d'éradication par réactivation du réservoir VIH-1.

L'autre objectif de l'étude des glycoprotéines d'enveloppe du réservoir est d'estimer dans quelle mesure l'expression des glycoprotéines d'enveloppe des génomes VIH du réservoir constitue un facteur de sélection naturelle, favorisant l'accumulation dans le réservoir de génomes délétés, hypermutés, ou exprimant des protéines d'enveloppe défectives. A l'inverse, il faut aussi comprendre pourquoi cette sélection naturelle est incomplète. Nous le savons, les virus du rebond virologique après arrêt du traitement sont parfaitement fonctionnels. S'il existe une sélection naturelle favorisant l'accumulation de virus défectifs, pourquoi certains d'entre eux semblent y échapper ? Notre hypothèse est que les LT CD4⁺ quiescents possédant des provirus intégrés qui perdurent dans le temps, seraient ceux qui

n'ont pas été réactivés ou ceux qui n'expriment pas de protéines d'enveloppe suffisamment stables et fonctionnelles.

Afin d'étudier les enveloppes exprimées à partir du réservoir VIH-1, nous avons choisi de séquencer, de cloner et de mesurer l'expression et la fonctionnalité d'enveloppes issues de deux sources distinctes. La première source est constituée des ARNm exprimés lors de la réactivation du réservoir VIH-1 des LT CD4⁺ quiescents d'individus sous cART et dont la virémie est indétectable. La deuxième source provient des virus émergeant après réactivation de ces LT CD4⁺ quiescents. La fonctionnalité des enveloppes a été mesurée par un test de fusion cellule-cellule. Quant à l'expression des glycoprotéines d'enveloppe, elle est quantifiée par la méthode Western Blot, par cytométrie et par immunofluorescence. La quantité d'enveloppes fonctionnelles correctement exprimées à partir du réservoir VIH-1 pourrait ainsi avoir un impact sur les stratégies de traitement développées actuellement par la communauté scientifique.

Matériels & Méthodes

I.Recrutement des individus de l'étude

Le recrutement des participants à cette étude a été préalablement approuvé par les comités éthiques de l'INSERM et de l'hôpital Saint Louis (CPP 2013/48). Onze individus, infectés par un VIH-1 de type B, sous cART, dont la virémie est indétectable, ont donné leur consentement pour un prélèvement de 40ml de sang afin d'étudier les glycoprotéines d'enveloppe du réservoir viral. Seuls quatre individus nous ont permis d'obtenir un VOA dont le résultat respecte la loi de Poisson (moins de 30% des puits sont p24 positifs) et sont ainsi en conditions clonales. Seuls ces quatre individus ont été sélectionnés pour l'étude (cf. **Tableau 1**).

Individus	Années VIH ⁺ avant ART	Années avec ART	Années indétectables	Dernier taux de LT CD4 ⁺ /mm ³	qVOA IUMP
7	4	8	8	482	0,73
10	4	5	5	840	1,72
14	<1	4	4	1015	1,21
19	>10	>15	13	933	1,78

Tableau 1.Description de l'historique VIH des individus et des qVOA clonaux.

II.Cultures cellulaires

II.A. Les lignées cellulaires

Les cellules HeLa TZM.bl et les HEK 293T provenant des archives du « NIH AIDS », sont cultivées dans du milieu modifié Dubelcco Eagle (DMEM) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), avec de la pénicilline (10U/mL) et de la streptomycine (10µg/ml) (milieu complet). Les HeLa TZM.bl sont des cellules issues de métastases du cancer de l'utérus d'Henrietta Lacks modifiés pour exprimer les récepteurs CD4, CCR5 et CXCR4 et pour posséder un gène rapporteur codant pour la bêta-galactosidase sous le contrôle du LTR du VIH. Les HEK 293T sont issues de cellules embryonnaires rénales d'un fœtus humain modifiées par transformation avec l'antigène T du SV40 pour être immortelles. Les cellules HeLa 273 Tat qui expriment constitutivement la protéine Tat du VIH-1 (fournies par Olivier Schwartz, Institut

Pasteur, Paris) sont cultivées dans du DMEM complétement par du méthotrexate à 1mM (Schwartz et al., 1994).

II.B. Les cellules primaires

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont cultivées dans le milieu du « Roswell Park Memorial Institute » (RPMI) complété avec 10% de sérum de veau foetal (SVF), avec de la pénicilline (10U/ml) et de la streptomycine (10µg/ml). Elles sont isolées des autres éléments du sang par centrifugation sur gradient de Ficoll (Histopaque, Sigma Aldrich), lavées par un tampon phosphate salin (PBS) puis resuspendues dans du milieu RPMI complet.

III. « *Viral outgrowth assay* » quantitatif (qVOA)

Afin d'appréhender le réservoir viral capable d'être potentiellement induit, une technique visant à mettre en co-culture des cellules du réservoir VIH-1 réactivées avec des cellules cibles permet de quantifier les virus émergents.

Après isolation des lymphocytes T CD4⁺ quiescents par sélection négative (CD4 Cocktail, CD25⁻, CD69⁻, HLA-DR⁻, Stem Cell) à partir des PBMC, ces derniers sont activés par des billes magnétiques anti-CD3 et anti-CD28 durant 24 heures (Dynabeads® Human-T-Activator, ratio ½, Invitrogen). 2.10⁵ cellules sontensemencées par puits dans une plaque 24 puits. En parallèle, des lymphocytes T CD4⁺ de donneurs sains sont isolés (CD4⁺ T-Cell Enrichment Kit, Stem Cell), activés durant trois jours avec de la phytohémagglutinine (PHA) à 1µg/ml (Thermo-Scientific) puis un jour avec de l'interleukine 2 (IL2) à 100U/ml (Recombinant human IL2, Immuno Tools GMBH) dans du milieu RPMI complet. Un jour après l'activation des LT CD4⁺ quiescents, 1.10⁵ de LT CD4⁺ du donneur sain sont ajoutés en co-culture. Cette opération est répétée toutes les semaines pour que les virus du réservoir puissent se propager. Afin de repérer dans quels puits des virus émergent, un ELISA dosant la protéine de capsid p24 (Innotest HIV Antigen mAb, Fujirebio, Igen) est effectué à la fin de chaque semaine. Le surnageant et la moitié de cellules des puits positifs sont conservés à -80°C séparément.

IV.Quantification de l'ADN viral total du réservoir VIH-1

Une extraction d'ADN est aussi effectuée sur les lymphocytes T CD4⁺ isolés (QIASymphony, DSP DNA Mini Kit, Qiagen) selon le protocole fourni par le fabricant. Puis l'ADN viral est quantifié par qPCR (GENERIC HIV DNA Cell kit, Biocentric) et rapporté au nombre de cellules (TC20 automatic cell counter, Biorad).

V. Amplification des env

Comme indiqué dans la **Figure 19**, les enveloppes du réservoir viral que j'ai étudiées proviennent de deux sources : des virus émergeant des VOA et des ARN associés aux LT CD4⁺ quiescents réactivés.

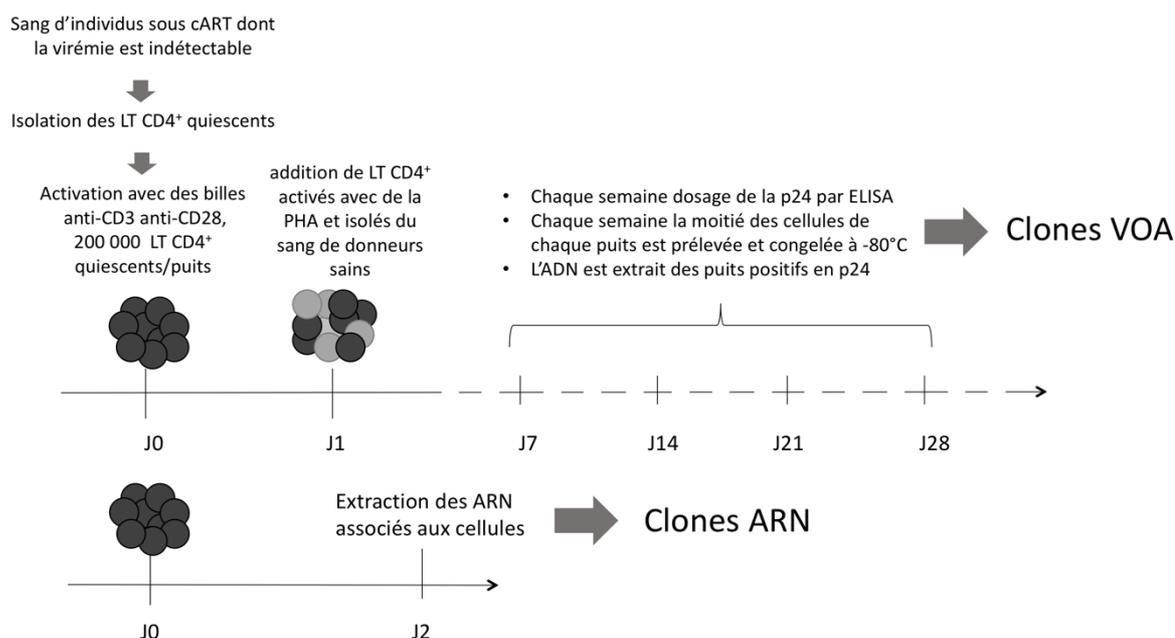


Figure 19. Schéma du protocole effectué pour obtenir les séquences des glycoprotéines d'enveloppes des virus émergeant des VOA et celle des ARN associés aux LT CD4⁺ quiescents du réservoir VIH-1, réactivés.

V.A. A partir des virus émergeant des VOA

V.A.1. Extraction d'ADN

Le taux de puits positifs en ELISA p24 variant entre 1/3 et 1/24, les virus émergents sont considérés comme clonaux (loi de Poisson). A partir des culots cellulaires (1.10^5 cellules)

des VOA congelés, l'ADN est extrait (QIAmp blood mini Kit, Qiagen) selon le protocole fourni par le fabricant.

V.A.2. PCR

Les gènes *env* issus des extractions d'ADN sont ensuite amplifiés par PCR nichée. Une première PCR est effectuée avec 10ng d'ADN extrait, 2mM de chaque dNTP, 0,2µM de chaque amorce, 3% de DMSO, 0,5U de la polymérase « Phusion Hot Start II High Fidelity » (Thermo-Scientific), avec la solution tampon « High Fidelity » à 1X finale, dans un volume total de 50µl. Une seconde PCR est effectuée avec 1µl de la première dans les mêmes conditions avec des amorces différentes (Cf. **Tableau 2**).

	Première PCR	Seconde PCR
Amorce sens	5' ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAG 3'	5'TGGATAGTCTAGAAGAAAGAGCAGAAGAC AGTGGCAATG 3'
Amorce antisens	5'TGTGTAGTTCTGCCAATCAGGGAAGTAG CCTTGTG 3'.	5'CCTTGTCCGGGACGCGTCTTAAAGGTACCT GAGGTGTGACTGG 3'
Condition d'amplification	Dénaturation initiale à 98°C 30s 36 cycles à - 98°C 30s -68°C 15s -72°C 1min 30s Extension finale à 72°C 10min	Dénaturation initiale à 98°C 30s 36 cycles à - 98°C 30s -68,5°C 15s -72°C 1min 30s Extension finale à 72°C 10min

Tableau 2. Conditions de PCR

V.B. A partir des ARNm transcrits par les LT CD4⁺ quiescents réactivés

V.B.1. Extraction d'ARN et rétro-transcription

Après deux jours d'activation avec des billes anti-CD3/CD28, 1.10⁶ LT CD4⁺ quiescents sont lysés en vue d'une extraction d'ARN (EasyMag, Biomérieux). L'extraction est éluée dans 50µl de tampon d'éluion.

500ng de chaque extraction d'ARN ainsi obtenus sont rétro-transcrits en ADNc par la polymérase « SuperScript III First Strand » (Thermo-Scientific) selon le protocole fourni par le fabricant.

V.B.2.PCR en dilution limite

Ensuite les séquences *env* ont été amplifiées par PCR nichée en condition limite en utilisant le protocole décrit précédemment (Cf.**Tableau 2**). Les PCR ont été effectuées à partir de 1µl de la rétro-transcription pure, diluée au 1/3, au 1/9, au 1/27 et au 1/81.

VI. Clonage des *env*

Chaque PCR est effectuée en duplicata et migrée sur un gel d'agarose 1%. Puis un des duplicatas est découpé sans exposition aux UVs et purifié sur colonne (Nucleosin Gel and PCR Clean Up kit, Macherey-Nagel). Dans le cas des PCR en dilution limite, seule la dernière dilution amplifiée est purifiée. Ensuite, un « TA tailing » est effectué sur les PCR purifiées afin d'ajouter des adénines aux extrémités des amplicons. Pour cela, 0,8µM d'ATP, 0,4µM de MgCl₂, 0,5µl de Tampon KCL, et 0,25µl de la polymérase recombinante de Thermo-Scientific sont ajoutés à 4µl de la PCR purifiée (100 ng) pendant 30 minutes à 72°C. Puis, 2µl de cette réaction est ajouté à 1µl de vecteur « TOPO XL » (Thermo-Scientific) durant 1h à température ambiante. Pour arrêter la réaction, 1µl de « Stop solution » est ajouté juste avant de procéder à la transformation de bactéries « One Shot TOP10 chemically competent *E.Coli* »(Thermo-Scientific). Pour chaque PCR, un minimum de 2 clonages et de 3 clones par clonage sont respectivement effectués et séquencés en vue d'obtenir une séquence consensus. La séquence consensus est alors digérée par les enzymes de restriction XbaI et MluI (Fast Digest buffer, Thermo-Scientific) pendant 1h, puis purifiée sur colonne après migration sur gel comme décrit précédemment. Enfin ces séquences *env* sont liguées (Quick Ligase, Thermo-Scientific) et clonées dans le plasmide pCGCG dont l'expression est indépendante de la protéine virale Rev (bactéries compétentes *E.Coli* JM109, Agilent Technologies).

VII. Séquençage des env

Chaque clone TOPO est envoyé à GATC et séquençé en utilisant les amorces :

-M13RP

-T7

-Amorce HIV B 1 : 5' GCCATGTGTAAAATTAACCCC 3'

-Amorce HIV B 2 : 5' TGGCAGGAAGTAGGAAAAGCAAT 3'

Puis les séquences sont reconstruites après alignement par le logiciel Geneious.

VIII. Fonctionnalité des Env

VIII.A. Test de fusion cellule-cellule

Afin d'étudier la fusogénicité des enveloppes du réservoir VIH-1, des tests de fusion cellule-cellule inspirés des travaux de Béatrice Labrosse ont été effectués (Su et al., 2009). Pour ce test, $2 \cdot 10^5$ cellules Hela 273 ont été transfectées avec 500ng pCGCG Env en utilisant le réactif JetPEI (Polyplus, Ozyme) en plaques 24 puits. Puis 24h après, $7 \cdot 10^3$ Hela 273 Tat transfectées ont été mises en co-culture avec $7 \cdot 10^3$ Hela TzM.bl en plaque 96 puits en triplicata. L'expression et donc l'activité du gène rapporteur codant pour la Beta-galactosidase, est représentative de la quantité de Tat dans la cellule cible TzM.bl et donc de la fusogénicité des enveloppes. Cette activité est mesurée par chimioluminescence (Beta-Gal Reporter Gene chemiluminescence assay, Roche) selon le protocole fourni par le fabricant. Pour normaliser cette mesure en RLU (Relative Chemiluminescence Unit) sur le nombre de cellules, un test de quantification des protéines totales est effectué en parallèle (Bradford, Biorad). Ces expériences sont répétées trois fois pour chaque enveloppe du réservoir VIH-1.

VIII.B. Test d'infectivité

Pour confirmer la fonctionnalité des enveloppes du réservoir VIH-1, des tests d'infectivité avec des pseudo-particules virales ont été réalisés. Des HEK 293T ont été transfectées avec $1.5 \mu\text{g}$ du plasmide pNL4.3 Δenv Luciférase Rénilla et $2 \mu\text{g}$ du plasmide pCGCG Env au phosphate de calcium. Le milieu a été changé 6h post-infection puis le surnageant a été récolté

48h après. La quantité de p24 a été dosée par ELISA (Clontech, Takara Biosciences) selon le protocole fourni par le fabricant. Des cellules HeLa TZM.bl ont été infectées avec 6,25, 12,5, 25 et 50ng de p24 en triplicata. Deux jours après infection, les cellules sont lysées et un test mesurant l'activité de la Beta-galactosidase est effectué comme expliqué précédemment (Cf. VIII.A).

IX. Expression des Env

IX.A. Western Blot (Immuno-buvardage)

2.10⁵ Hela 273 Tat ont été transfectées avec 2µg de pCGCG Env et 2µg de pCCGK IRES GFP avec le réactif JetPEI (Polyplus, Ozyme) en plaque 6 puits. Deux jours après, les cellules sont lysées dans du tampon RIPA 1X (NaCl 150mM, NP40 1%, Sodium deoxycholate 0,1%, SDS 0,1%, Tris-HCl pH8 50mM). Après quantification des protéines totales par un test de Bradford (Biorad) selon le protocole fourni par le fabricant, 20µg de chaque lysat est resuspendu dans du tampon de Laemmli 1X (TrisHCl 0,2M, Glycerol 40%, beta-mercaptoéthanol 10mM, SDS 10%, bromophénol bleu 0,05%) et chauffé 5min à 95°C. Le mélange est ensuite déposé sur un gel de polyacrylamide (NUPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mm, Thermo-Fischer) durant 1h à 160Volt dans un tampon adapté (MOPS SDS Running Buffer 1X, Thermo-Fischer). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane polyvynilidene difluoride (PVDF, Immobilon 0,45µm, Millipore) préalablement activée au méthanol à 400mA durant 1h30. La membrane est saturée avec du PBS complété avec 0,5% de tween 20 et 5% de lait en poudre écrémé (Régilait), pendant 1h à température ambiante sous agitation. La membrane est incubée avec les anticorps primaires anti-Env neutralisant à large spectre, les bNAbs (10E8, 10-1074, N6, PG16, PGDM 1400, PGT 151, PGT 128 et BNC 117 (Fournis par Hugo Mouquet, Institut Pasteur, Paris) dilués dans du PBS Tween20 0,5% lait 5%, à 4µg/ml, 18h à 4°C, sous agitation. Après trois lavages au PBS Tween20 0,5%, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire de chèvre antihumain couplé à la peroxydase de raifort (Goat anti-human IgG Fc Cross-Absorbed Secondary Antibody HRP, Invitrogen) dilué au 1/5000. Après 3 lavages, la membrane est révélée après ajout du substrat de l'enzyme (Immobilon, Millipore). Pour normaliser avec la quantité d'actine, la membrane est ensuite incubée avec un anticorps primaire monoclonal de souris (anti-alpha-beta-actine, Sigma A1978) dilué au 1/5000 puis

incubée avec un anticorps secondaire (anti-mouse HRP, GE, NA 931 VS) dilué au 1/5000. La chemoluminescence a été acquise grâce à une caméra (MyECL Imager, Thermo Fischer) et les images analysées sur le logiciel ImageJ.

IX.B. Cytométrie en flux

2.10^5 Hela 273 Tat ont été transfectées avec $2\mu\text{g}$ de pCGCG Env et $2\mu\text{g}$ de pCCGK IRES GFP avec le réactif JetPEI (Polyplus, Ozyme) en plaque 6 puits. Après deux jours, les cellules sont récoltées dans 1ml de PBS EDTA 0,5mM puis lavées et incubées dans $100\mu\text{l}$ de PBS complété avec 10% de SVF durant 1h à 37°C . Puis les cellules sont incubées avec les bNAbs à $150\mu\text{M}$ dans $100\mu\text{l}$ de PBS SVF 10% pendant 30min à 37°C . Après 3 lavages au PBS SVF 10%, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire de chèvre antihumain, conjugué au fluorochrome Alexa-Fluor 647 (Thermo-Scientific), dilué au 1/2000 durant 25min à 4°C . Après deux lavages au PBS SVF 10%, et un lavage au PBS, les cellules sont fixées au paraformaldéhyde (PFA) 1% puis analysées au FACS Canto II (Becton Dickinson). Les résultats ont été analysés sur le logiciel FlowJo X (Treestar).

IX.C. Immunofluorescence

2.10^5 Hela 273 Tat ont été transfectées avec $2\mu\text{g}$ de pCGCG Env avec le réactif JetPEI (Polyplus, Ozyme) en plaque 6 puits. Puis 24h après, les cellules sont décollées à l'aide de PBS EDTA 0,5mM puis lavées et 1.10^5 cellules sontensemencées sur des lamelles de 14mm^2 dans des plaques 24 puits en duplicata. 24h après, elles sont incubées avec les bNAbs à $10\mu\text{M}$ dilués dans du PBS SVF 10% pendant 1h à 37°C . Après trois lavages en PBS SVF 10%, elles sont incubées avec un anticorps secondaire antihumain couplé à l'Alexa-Fluor 647 (Thermo-Fischer) dilué au 1/2000 dans du PBS SVF 10% durant 1h à 4°C . Après deux lavages au PBS SVF 10%, et un au PBS, les cellules sont fixées à la PFA 4%. Après deux lavages au PBS, elles sont perméabilisées avec le détergent TritonX100 0,5% dilué dans du PBS BSA 5%, durant 10min à température ambiante (TA). Puis après deux lavages au PBS, elles sont incubées avec du DAPI (Invitrogen) dilué au 1/10 000 dans du PBS, pendant 5sec à TA, afin de marquer les noyaux. Puis elles sont à nouveau lavées au PBS, et montées sur lames (Prolong Gold Reagent, Thermo-Scientific). Les lames ont été observées sur un microscope LSM 800 (Carl Zeiss). 5 champs

contenant de 15 à 20 cellules ont été pris en trois dimensions (12-18 Zstack) pour chaque condition testée. La quantification des points de marquage des enveloppes a été faite sur ImageJ (Analyze particle) après une projection en Z et une transformation des images en couleurs binaires (Cf. **Figure 20**).

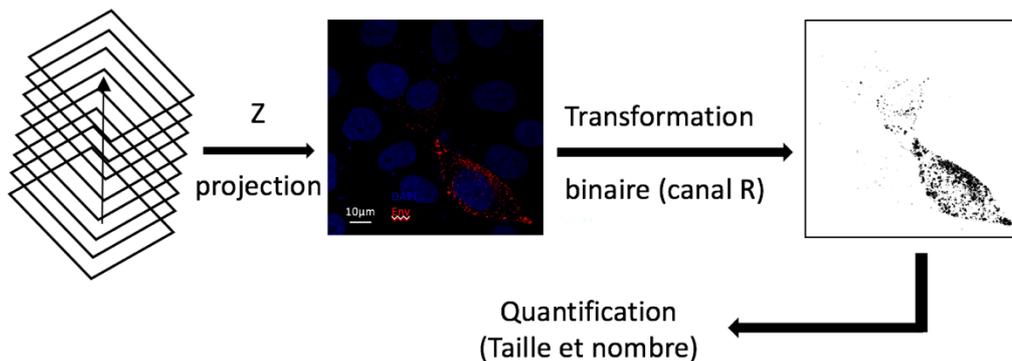


Figure 20. Schéma expliquant les étapes effectuées pour la quantification des glycoprotéines d'enveloppes présentes à la surface des cellules.

Exemple d'une image de microscopie prise sur des cellules Hela transfectées avec le plasmide pCGCG NL-AD8.

X. Analyse phylogénétique

Les séquences nucléotidiques *env* ont été alignées sur Clustal W, et les arbres phylogénétiques ont été générés sur FastTree avec la méthode «Maximum likelihood » et sont représentés en format Newick (Aldrich, 1997; Price et al., 2010). Les analyses ont été effectuées sur la plateforme « Mobyle and Galaxy » de l'Institut Pasteur. Le tropisme des enveloppes a été déterminé en utilisant l'algorithme de Geno2Pheno (Beerenwinkel et al., 2003).

XI. Analyses statistiques

Les corrélations sont effectuées selon le modèle de Pearson ou Spearman et les comparaisons entre les enveloppes sont faites selon le modèle de Mann-Whitney, sur l'outil informatique GraphPad Prism version 6.

Résultats

I. Quantification des virus émergent du réservoir VIH-1 après réactivation

Comme montré précédemment par plusieurs équipes (Bruner et al., 2016; Ho et al., 2013), la quantité d'ADN total des LT CD4⁺ quiescents est de l'ordre de 5 000 provirus par million de cellules alors que moins de 10 cellules sur un million sont capables de produire un virion infectieux (**Figure 21**). Ce décalage est principalement dû à la présence de mutations et de délétions au sein des séquences intégrées latentes mais pas uniquement (Bruner et al., 2016; Ho et al., 2013). En effet, la proportion de séquences intactes est 60 fois supérieure à la proportion capable de produire des virions infectieux.

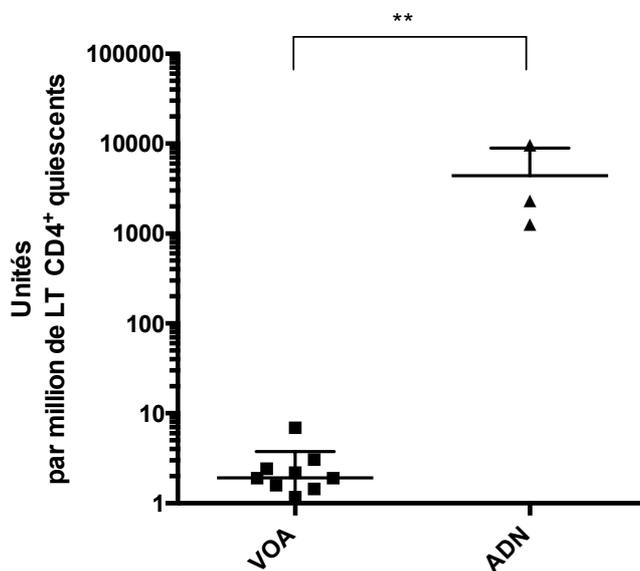


Figure 21. Quantification et comparaison des réservoirs VIH-1 totaux et fonctionnels.

La quantification des provirus intégrés des LT CD4⁺ quiescents circulants par qPCR. Quantification des virus émergent des LT CD4⁺ quiescents du réservoir VIH-1, réactivés par des billes anti-CD3-CD28, et capables de se propager chez des LT CD4⁺ de donneurs sains. (VOA)

Lors des VOA, les virus émergents ont été détectés par un ELISA dirigé contre la protéine de capsid p24, effectué tous les sept jours pendant 4 semaines. Deux particularités des virus de VOA ont été observées laissant suggérer que les virus sont plus ou moins compétents pour la réplication. Tout d'abord, les puits p24 positifs ne le restent pas forcément pendant les 4 semaines. En effet 25% des puits p24 positifs redeviennent p24 négatifs au cours du VOA (**Figure 22.A**). En outre, 16% des virus semblent émerger très tardivement car la protéine de capsid est détectable uniquement à la quatrième semaine de VOA (**Figure 22.B**). Le fait qu'une proportion de virus de VOA de 11 individus présentent de tels défauts de réplication suggère que leurs protéines ne sont pas toutes fonctionnelles.

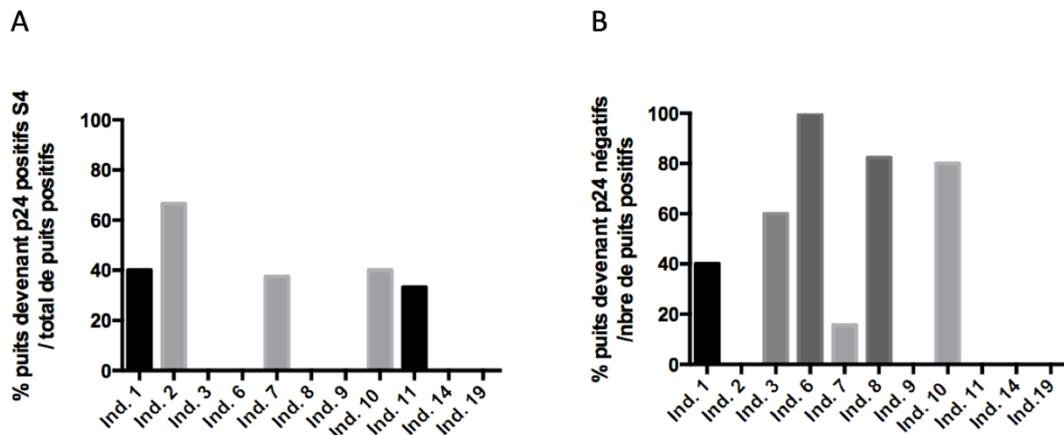


Figure 22. Etude des virus émergent des VOA.

A. Pourcentage des puits devenus positifs après 4 semaines de coculture des LT CD4⁺ quiescents réactivés avec des LT CD4⁺ de donneurs sains, par rapport au nombre de puits p24 positifs en ELISA par individu. **B.** Puits p24 positifs en ELISA puis négatifs durant les 4 semaines de VOA.

La suite de l'étude comprend quatre individus qui ont été infectés par un virus VIH-1 de sous-type B. Tous ont une virémie indétectable depuis au moins 4 ans. Les caractéristiques de chaque individu sont résumées dans le **Tableau 1**. L'individu 14 a été traité le plus tôt, dans l'année suivant son dernier test VIH négatif. Les individus 7 et 10 ont tous les deux été traités 4 ans après avoir été diagnostiqués positif au VIH. L'individu qui a été traité le plus tardivement et aussi le plus longtemps avant d'être indétectable est l'individu 19. En effet avant d'être indétectable, pendant 10 ans, il a reçu des traitements à base de différentes combinaisons d'antirétroviraux qui n'étaient pas efficaces notamment à cause de résistances croisées. Pour chaque individu moins de 30% des puits du qVOA sont p24 positifs, les conditions de cultures sont donc clonales.

I. Analyse phylogénétique des séquences *env*

Après isolation et activation des lymphocytes T CD4⁺ quiescents, soit le gène *env* est amplifié à partir des ARNm des cellules activées, soit il est amplifié à partir de l'ADN des cellules infectées par les virus produits lors des VOA. Les séquences obtenues à partir des deux sources ne présentent pas de délétions internes remarquables par amplification PCR. Ces résultats indiquent que les séquences *env* sont entières ou du moins que les délétions de

la séquence codante n'affectent ni le cadre de lecture, ni les séquences en cis et en trans nécessaires à l'expression et à la stabilité du transcrit.

L'analyse phylogénétique des séquences *env* dérivées des ARNm et des virus réplicatifs de VOA a été obtenue par l'alignement des séquences des quatre individus et est représentée sur la **Figure 23**. Toutes les séquences dérivant des virus de VOA sont génétiquement intactes comme l'est la majorité des séquences dérivées des ARNm. En effet, 26 % des séquences dérivées des ARNm comportent des codons stop prématurés dus dans la majorité des cas à des mutations G→A causées par le facteur de restriction cellulaire APOBEC3G.

La diversité des séquences *env* semble refléter chez chaque individu la durée d'infection avant la prise d'ART efficaces. L'individu 14 est celui qui a été traité le plus tôt après son infection et qui présente le moins de diversité génétique au sein de ses séquences d'enveloppes (« *average paired distance* », APD = 0.6%). L'individu 19 quant à lui, a été le plus longtemps infecté par le VIH sans cART efficace, et présente la diversité génétique la plus importante (4.8%), alors que les individus 7 et 10 qui ont des durées d'infection et de traitement comparables présentent des diversités génétiques similaires (2.2%). En outre, les quatre individus présentent des séquences identiques : VOA B5 et VOA D2 pour l'individu 7, ARN 35 et 26 ainsi que les ARN 5 et 11 pour l'individu 14, VOA 3 et ARN 5 ainsi que les ARN 4 et 7 pour l'individu 19, et les VOA B5 et A2 pour l'individu 10. Ces séquences identiques sont sûrement issues d'expansions clonales, retrouvées fréquemment, d'après plusieurs études récentes, dans les réservoirs VIH-1 de LT CD4⁺ quiescents (Lorenzi et al., 2016; Maldarelli, 2015; Maldarelli et al., 2014; Wagner et al., 2014). Le tropisme des enveloppes a été déterminé par l'algorithme G2P. Pour les individus 7, 10, et 14 toutes les enveloppes sont CCR5 tropiques. Pour l'individu 19, la plupart des enveloppes sont CCR5 tropiques, les seules qui sont CXCR4 tropiques sont des séquences hypermutées.

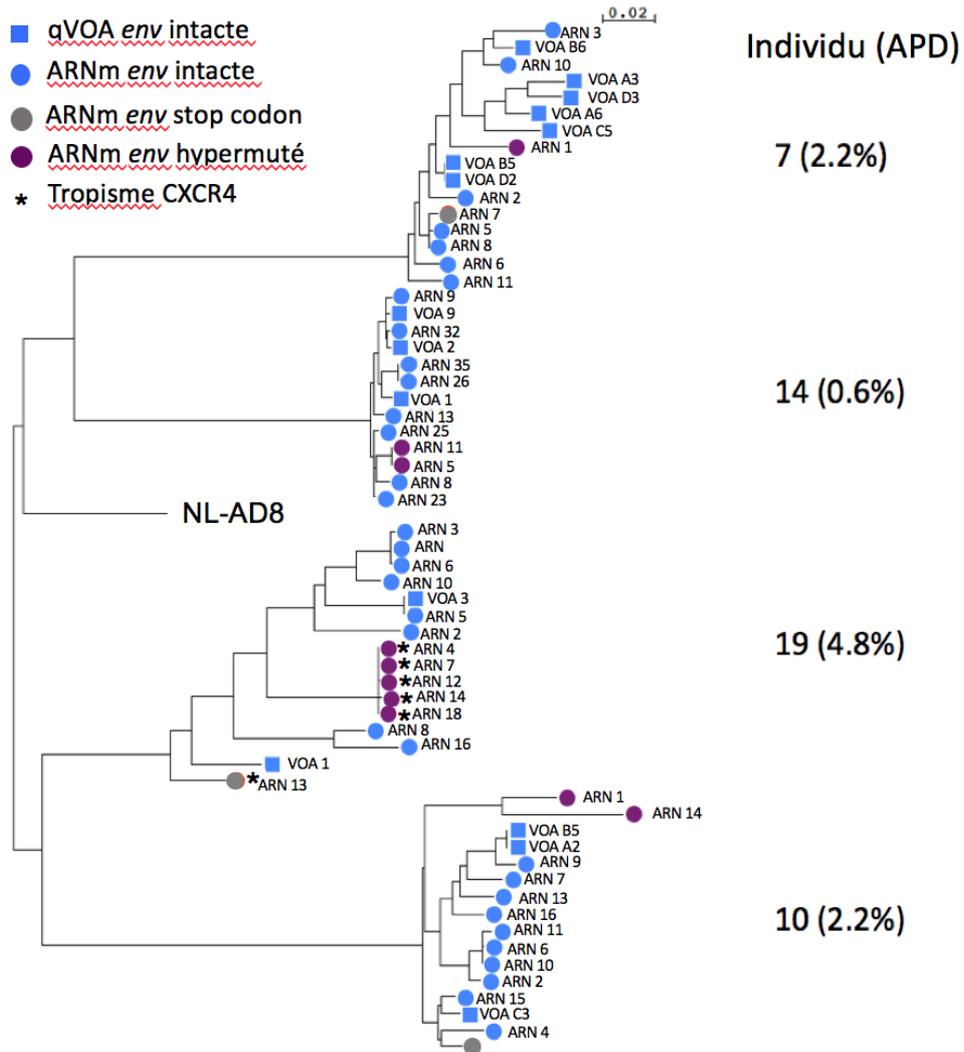


Figure 23. Analyse phylogénétique des séquences *env* dérivées des ARNm et des qVOA.

L’analyse des gènes *env* a été réalisée par alignement sur Clustal W et l’arbre phylogénétique a été construit à l’aide des moniteurs FastTree et Newick pour les quatre individus. Les séquences dérivées des ARNm, amplifiées en condition limite et de longueur attendue, sont représentées en rond et les séquences dérivés de virus répliquatif de VOA sont représentées en carré. Pour chaque individu, la distance moyenne entre deux séquences est indiquée entre parenthèse (APD, « *average pairwise distance* »). Les séquences intactes sont représentées en bleu, les séquences hypermutées par APOBEC3G en violet et les séquences comportant un codon stop prématuré sont en gris. Le tropisme des enveloppes a été déterminé par l’algorithme G2P. Les enveloppes de tropisme CXCR4 sont annotées d’une étoile alors que les autres sont de tropisme CCR5.

II. Fonctionnalité des enveloppes du réservoir VIH-1

II.A. Fusogénicité des enveloppes du réservoir VIH-1

La fonction principale des glycoprotéines d’enveloppe est de médier l’entrée du virus dans la cellule cible, en induisant après fixation sur le récepteur et le corécepteur, la fusion de

la membrane virale avec la membrane plasmique. Ainsi, pour étudier la fonctionnalité de cette protéine, nous avons utilisé un test dit de fusion cellule-cellule. Ce test permet par des cellules reportrices CCR5 et CXCR4 tropiques de quantifier la fusogénicité des enveloppes. En effet les enveloppes sont exprimées dans des cellules modifiées pour exprimer constitutivement le facteur d'activation de transcription nécessaire l'expression du gène Lac-Z des cellules reportrices. Ainsi, si l'enveloppe est fonctionnelle, elle permettra la fusion des membranes des deux types cellulaires et ainsi l'expression de la beta-galactosidase. L'activité de cette enzyme est reportée en unité relative de luminescence (RLU) sur la **Figure 26** et est représentative de la fusogénicité des enveloppes du réservoir VIH-1 des LT CD4⁺ des quatre individus.

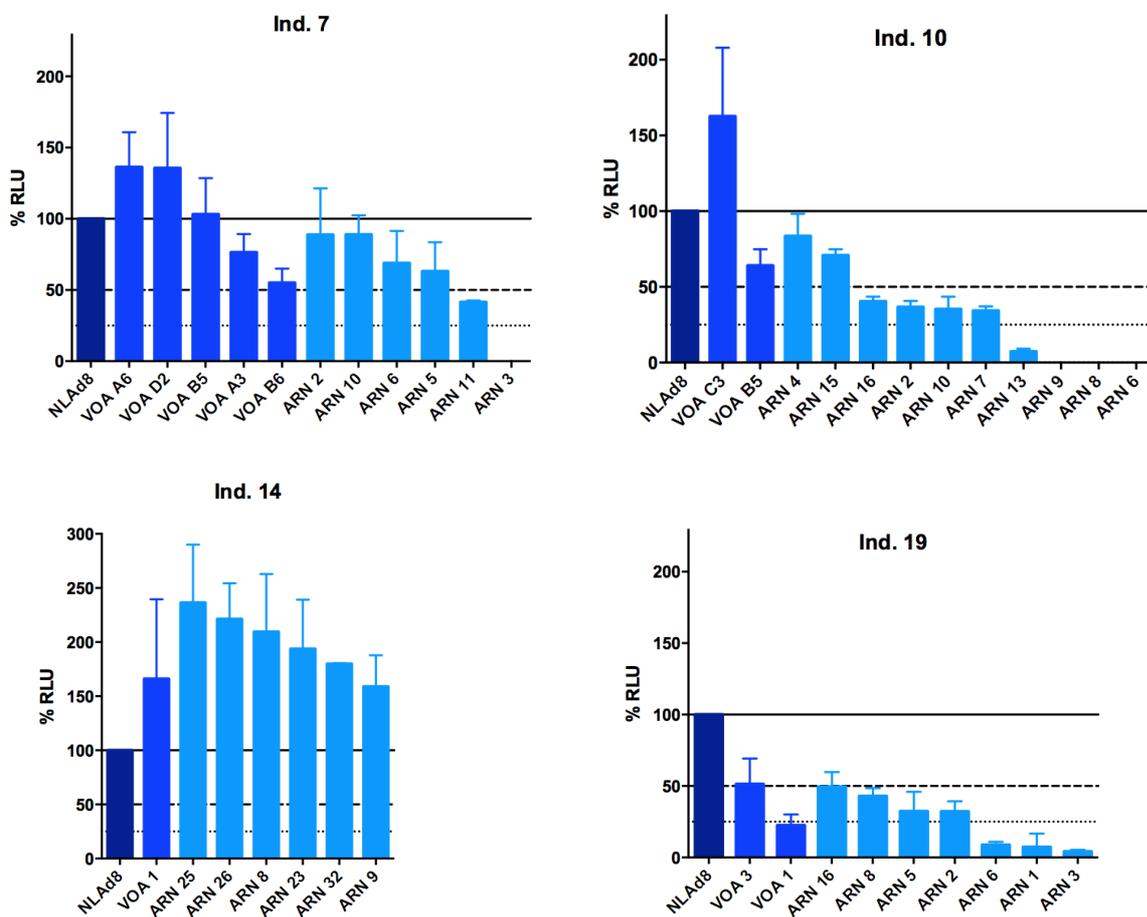


Figure 24. Analyse fonctionnelle de la fusogénicité des enveloppes du réservoir intra-individu.

Des HeLa 273 Tat transfectées avec les pCGCG EnvR de chaque individu ont été mises en co-culture avec des cellules reportrices HeLa TZM.bl. Les résultats sont représentés en % RLU mesuré par rapport au contrôle NLAD8 (en bleu foncé). La fusogénicité des enveloppes dérivées des ARNm sont représentées en bleu ciel, celles dérivées des virus de qVOA en bleu royal.

Les enveloppes testées sont toutes celles qui sont génétiquement intactes.(23). Les résultats sont exprimés en % de la valeur de RLU la plus élevée obtenue avec le virus contrôle NL-AD8, CCR5 tropique. Des différences de fusogénicité sont observées intra (**Figure 24**) et inter-individu (**Figure 25**). Pour l'individu 14, dont la diversité des séquences *env* est assez restreinte, les protéines d'enveloppe ne présentent pas de différences majeures de fonctionnalité comparées à NL-AD8. Pour l'individu 7, à part une enveloppe non fonctionnelle, les Env dérivées des ARNm ont une capacité proche de 50% de celle du contrôle, et les Env dérivées des VOA ont une capacité qui varie de 50% à plus de 100% de celle du contrôle. Pour les individus 10 et 19, la majorité (respectivement 80 et 100%) des Env dérivées des ARNm ont une faible capacité de fusion, inférieure à 50% du contrôle.

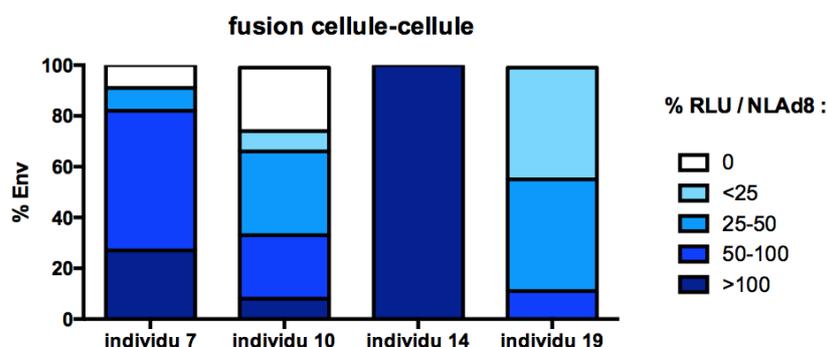


Figure 25. Analyse fonctionnelle de la fusogénicité des enveloppes du réservoir VIH-1 inter-individu.

Des HeLa 273 Tat transfectées avec les pCGCG EnvR de chaque individu ont été mises en co-culture avec des cellules reportrices TZM.bl.

Au total, 90% des Env dérivées des VOA ont une capacité de fusion supérieur à 50% de celle du contrôle alors que seulement 41% des Env dérivées de ARNm le sont aussi. En effet, 27% des Env dérivées des ARNm ont une capacité de fusion inférieure à 25% de celle de NL-AD8 dont 14% sont non fonctionnelles.

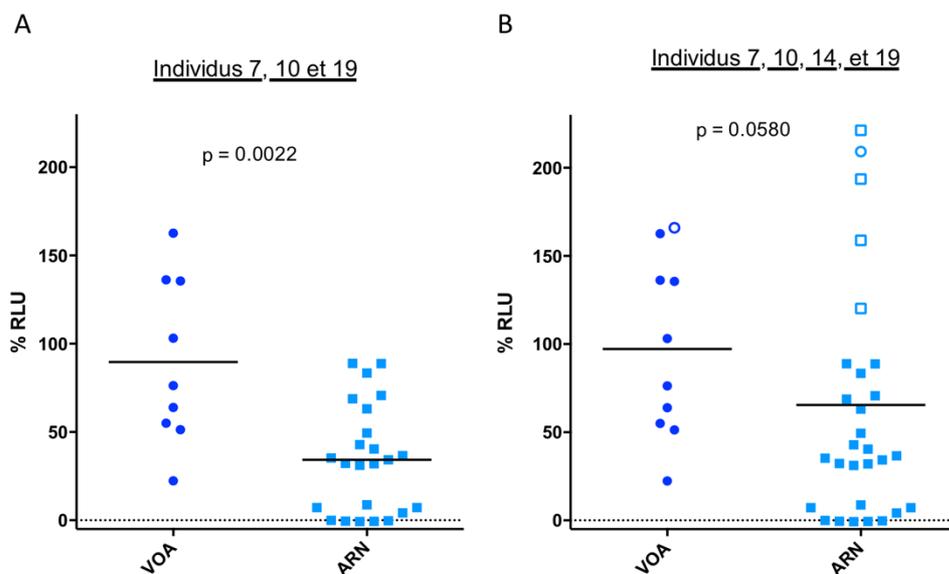


Figure 26. Comparaison de la fusogénicité des Env dérivées des ARNm et des qVOA.

A. La comparaison a été effectuée selon le test statistique de Mann-Whitney. Celle effectuée avec les individus 7,10 et 19 à gauche. **B.** Celle avec tous les individus à droite comporte les individus 7,10,19 en carré et rond plein, et l'individu 14 en carré et rond vide.

En comparant la phylogénie et la fusogénicité des enveloppes (**Figure 27**), aucun groupe génétique se distingue parmi les individus pour ses capacités de fusion. La capacité de fusion des Env dérivées des VOA est significativement supérieure à celle des Env dérivées des ARNm pour les individus 7,10 et 19 (**Figure 26**, $p=0,002$). Lorsque l'individu 14, qui a été traité relativement tôt par rapport aux autres, est rajouté à l'analyse statistique, cette différence de capacité de fusion entre les Env dérivées des VOA et celle dérivées de ARNm s'atténue (**Figure 26**, $p=0,0580$).

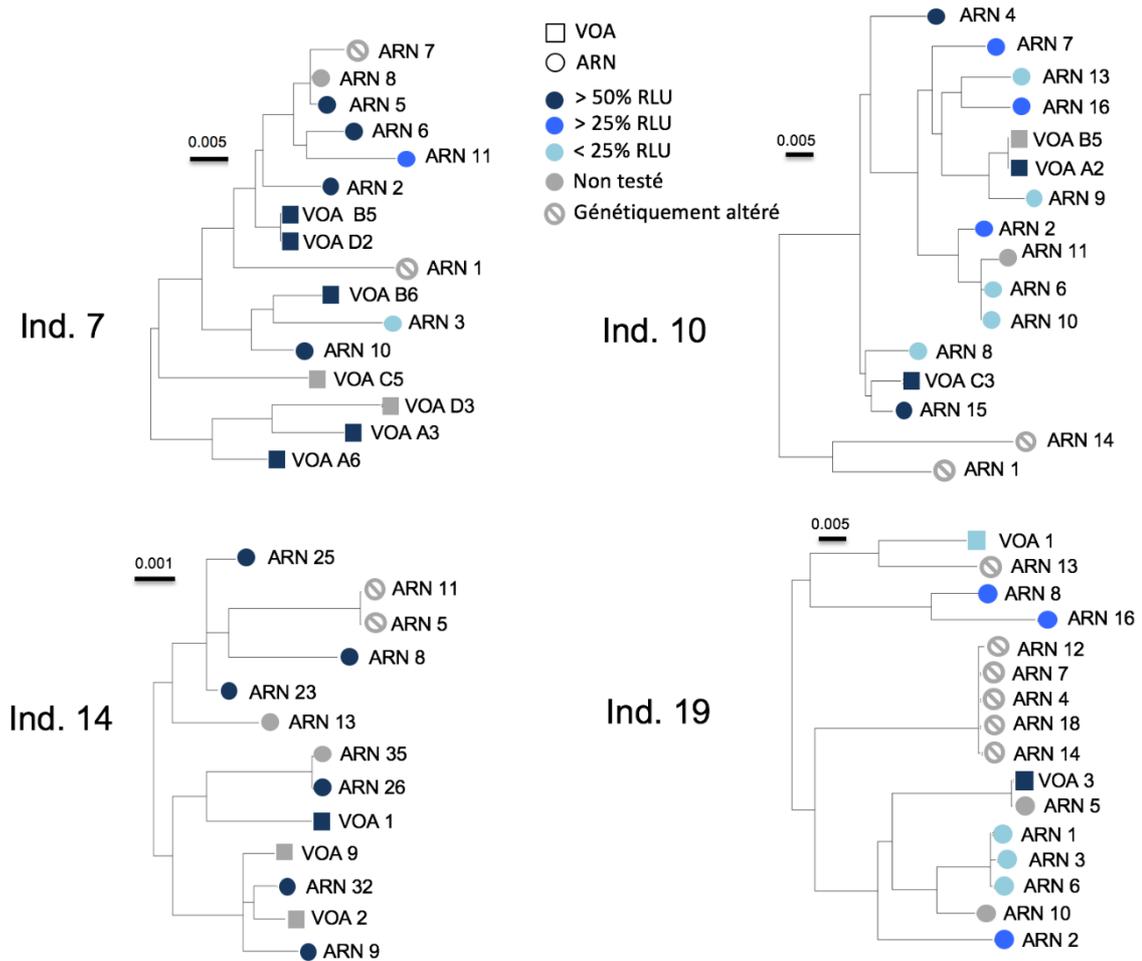


Figure 27. Phylogénie et capacité de fusion des enveloppes du réservoir VIH-1.

L'analyse des gènes *env* a été réalisée par alignement sur Clustal W et l'arbre phylogénétique a été construit à l'aide des moniteurs FastTree et Newick pour les quatre individus. Les séquences dérivées des ARNm, amplifiées en condition limite et de longueur attendue, sont représentées en rond et les séquences dérivées de virus répliquatif de VOA sont représentées en carré. En bleu foncé, celles dont la capacité de fusion est supérieure à 100 % de celle du contrôle NL-AD8. En bleu ciel, celles dont la capacité de fusion est inférieure à 25% de celle de NL-AD8.

II.B. Infectivité des pseudo-particules virales portant les Env du réservoir VIH-1

Pour confirmer le test de fusion cellule-cellule, un test d'infectivité de pseudo-particules NL4.3 modifiées pour exprimer les enveloppes du réservoir VIH-1 a été effectué. Plus de la moitié des enveloppes des quatre individus ont été utilisées pour les tests d'infectivité. Les résultats de ces tests sont corrélés avec ceux obtenus avec le test de fusion cellule-cellule. Ainsi la fusogénicité des Env dérivées du VOA et des ARNm est corrélée à l'infectivité des pseudo-particules portant ces Env ($p=0.01$, $r=0.55$) et le test de fusion cellule-cellule est pertinent pour évaluer la fonctionnalité des enveloppes du réservoir VIH-1. Ces données confirment donc qu'une part non négligeable des séquences *env* intactes, du

réservoir VIH-1, exprimées en ARNm produisent des protéines d'enveloppe peu fonctionnelles voir sans aucune aptitude pour la fusion.

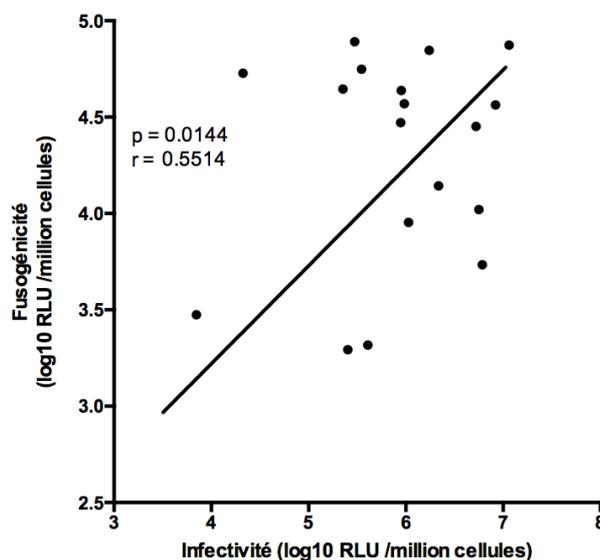


Figure 28. Comparaison du test de fusion cellule-cellule avec le test d'infectivité de pseudo-particules.

Corrélation de Pearson. Pour le test de fusion cellule-cellule, des HeLa T2M.bl sont mises en co-culture avec des HeLa Tat transfectées par le plasmide pCGCG codant les Env du réservoir VIH-1. Pour le test d'infectivité, des HeLa T2M.bl sont infectées avec des-particules NL4. 3 delta Env pseudo-typées avec les Env du réservoir VIH-1 des quatre individus 7,10,14 et 19

III.Expression des enveloppes du réservoir VIH-1

III.A. Expression totale

Afin de connaître la nature des défauts des enveloppes observés dans les tests de fusion cellule-cellule et d'infectivité, l'expression des protéines d'enveloppes a été quantifiée par Western Blot (WB). Un spectre d'enveloppe dérivées de VOA et dérivées des ARNm représentatif de la fonctionnalité des enveloppes du réservoir VIH-1 a été choisi pour effectuer le WB. Les protéines d'enveloppes sont reconnues par des anticorps monoclonaux neutralisants connus pour reconnaître un large spectre d'enveloppes primaires de individus visant différentes régions de la gp41 et de la gp120 (Bruel et al., 2016; Mouquet, 2014). Une différence importante de production de protéine d'enveloppe est observée intra-individu et inter-individu (**Figure 29**). En effet seules les enveloppes « individu 10 VOA C3, individu 14

ARN 25 et individu 14 VOA 1 » semblent avoir une expression similaire à celle de NL-AD8. Toutes les autres sont exprimées en moindre quantité voire pas du tout produite comme les enveloppes « individu 10 ARN13 et ARN15 ».

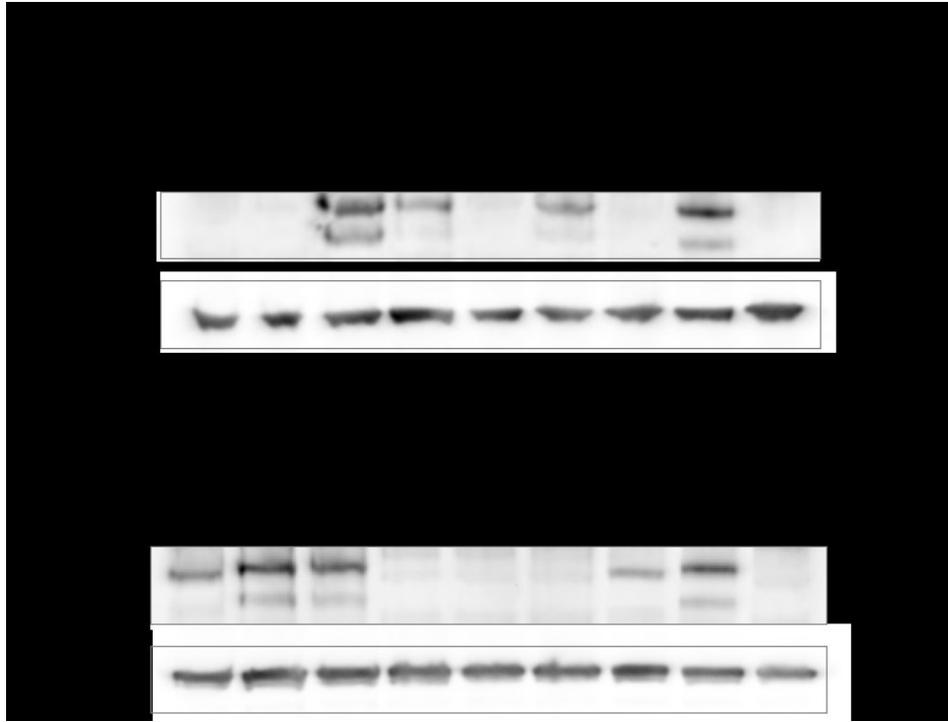


Figure 29. Expression des enveloppes du réservoir VIH-1.

Western Blot de HeLa transfectées par le plasmide pCGCG exprimant les différentes enveloppes du réservoir VIH-1 de ces quatre individus avec des anticorps neutralisants dirigés contre la gp120 et donc aussi contre la gp160 du VIH-1 (bNAbs : OE8, 10-1074, N6, PG16, PGDM 1400, PGT). La quantité de la glycoprotéine d'enveloppe est normalisée par rapport à celle de la protéine cellulaire d'actine.

Une forte corrélation est retrouvée entre la fusogénicité des enveloppes et leur expression en protéine normalisée par rapport à la quantité d'actine. Ces résultats suggèrent que le défaut observé dans les tests de fusion cellule-cellule et d'infectivité n'est pas dû uniquement à un défaut de fonctionnalité des enveloppes mais principalement dû à un défaut de production ou de stabilité des protéines d'enveloppe dans la cellule ($p=0.0004$, $r=0.8108$, **Figure 30**).

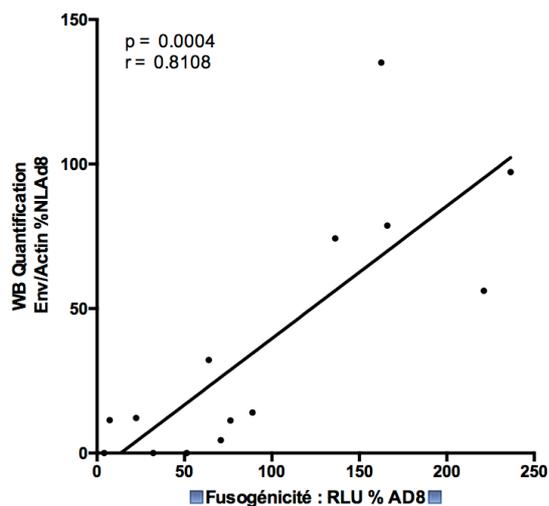


Figure 30. Défauts d'expression des enveloppes du réservoir VIH-1 et conséquences sur leur fonctionnalité.

Corrélation de Pearson entre l'expression des Env mesurée par densitométrie du Western Blot effectué sur des HeLa transfectées par pCGCG EnvR, avec des anticorps primaires dirigés contre l'enveloppe du VIH-1 (bNAbs : 0E8, 10-1074, N6, PG16, PGDM 1400, PGT) et leur fusogénicité mesurée par le test de fusion cellule-cellule effectué sur des HeLa T2M.bl mises en co-culture avec des HeLa Tat transfectées par pCGCG EnvR.

III.B. Expression au niveau de la membrane plasmique

III.B.1. Nombre de cellules exprimant les enveloppes à la surface

Les défauts de fusogénicité et d'infectivité observés peuvent aussi être dûs à un mauvais adressage des protéines d'enveloppe au niveau membranaire. Afin d'étudier cette option, des marquages extracellulaires ont été effectués sur le même panel d'enveloppes observées en Western Blot. Le marquage est réalisé avec les bNAbs et quantifié en cytométrie de flux. Les cellules sont co-transfectées avec un plasmide codant les enveloppes et un plasmide codant la protéine GFP. Le pourcentage de cellules exprimant à leur surface l'enveloppe est calculé par rapport au nombre de cellules exprimant la protéine contrôle GFP. Les résultats sont représentés en pourcentage des valeurs obtenues avec l'enveloppe contrôle de NL-AD8 pour lequel les valeurs sont de 10 à 14 fois supérieures. Une corrélation est observée entre le nombre de cellules exprimant à leur surface les enveloppes et leur fonctionnalité ($p=0,0049$, $r=0,6025$, **Figure 31**). Les résultats sont concordants avec ceux obtenus en Western Blot confirmant que les enveloppes du réservoir VIH-1 qui ne présentent pas de capacité de fusion sont en fait présentes en faible quantité dans les cellules notamment à leur surface. Ces données suggèrent que ces enveloppes présentent des défauts

d'expression, de maturation, de stabilité, et d'adressage importants. Le défaut de fusion de certaines enveloppes ne semble pas être corrélé uniquement à un défaut de production. En effet, par exemple pour l'enveloppe VOA 1 de l'individu 19, le taux d'expression de la protéine, quantifiée par Western Blot et par le marquage en cytométrie de flux, est supérieur à celui attendu compte tenu de sa capacité de fusion observé lors des tests de fusion cellule-cellule. Ce décalage pourrait être dû à un défaut de fonctionnalité ne perturbant pas ou peu son expression et sa stabilité au sein de la cellule. Cette enveloppe peu fonctionnelle a tout de même permis la réplication d'un virus car elle provient d'un puits qui resta positif en ELISA p24 sur trois semaines de VOA.

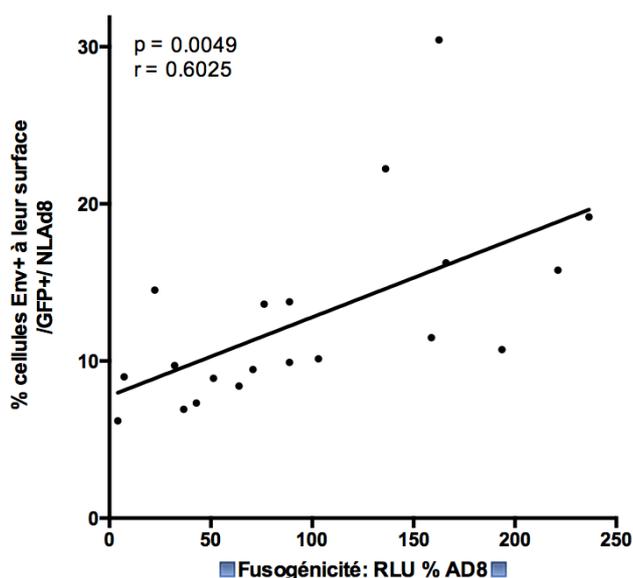


Figure 31. Expression membranaire des enveloppes du réservoir VIH-1.

Corrélation de Pearson entre l'expression des Env à la surface cellulaire mesurée par cytométrie de flux avec des anticorps primaires dirigés contre l'enveloppe du VIH-1 (bNAbs : 0E8, 10-1074, N6, PG16, PGDM 1400, PGT) sur des HeLa transfectées avec pCGCG EnvR et leur fusogénicité mesurée par le test de fusion cellule-cellule effectué sur des HeLa TZM.bl mises en co-culture avec des HeLa Tat transfectées par pCGCG EnvR.

III.B.2. Quantité d'enveloppes à la surface des cellules

L'expression des enveloppes du réservoir viral à la surface des cellules a aussi été observée par microscopie à immunofluorescence. Le marquage des enveloppes a été effectué comme précédemment avec les bNAbs. Ces expériences ont été effectuées sur un panel de sept enveloppes représentatives du panel de fusogénicité. Parmi les enveloppes exprimées, certaines sont regroupées en amas et d'autres sont plus dispersées (**Figure 32**). Les enveloppes du contrôle NL-AD8 et celles du VOA C3 de l'individu 10 sont exprimées en grande quantité et observées groupées à la surface cellulaire. Celles de l'ARN 26 de l'individu 14 sont observées en aussi grande quantité mais moins groupées en amas. Quant à celles du VOA A3 de l'individu 7, elles sont observables en amas mais moins nombreuses à la surface cellulaire. Celles de l'ARN 13 de l'individu 10 et de l'ARN 3 de l'individu 19 sont peu nombreuses et non regroupées. Or la fusogénicité de ces deux dernières est à peine détectable par le test de fusion cellule-cellule.

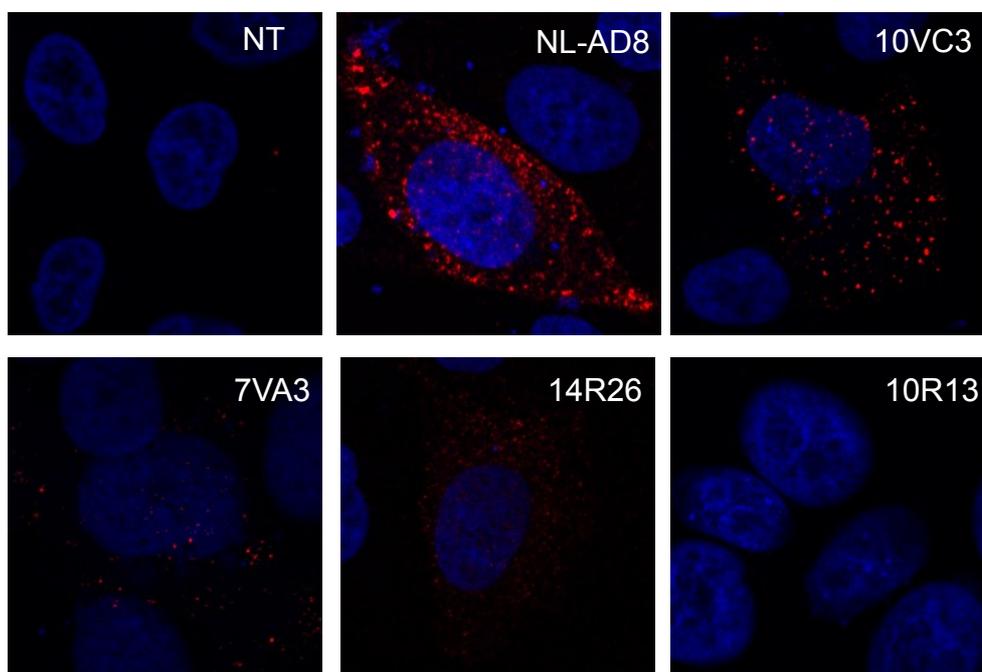


Figure 32. Expression des enveloppes du réservoir VIH-1 à la surface des cellules.

Immunofluorescence de HeLa 273 Tat transfectées par les plasmides pCGGG Env NL-AD8, individu 10 VOA C3, individu 7 VOA A3, individu 14 ARN 26, individu 10 ARN 13. Les enveloppes virales sont marquées par les bNAbs (en rouge), le noyau des cellules est contre-coloré par du DAPI (en bleu).

Afin de quantifier les enveloppes au niveau de la membrane plasmique des cellules, une projection sur l'axe Z des images de microscopie a été effectuée sur 5-8 plans (30-50 cellules) par enveloppes puis les points de marquage ont été quantifiés et rapportés au nombre de cellules.

Une corrélation est notable entre le nombre d'amas d'enveloppes exprimées à la surface des cellules transfectées et leur capacité de fusion ($p < 0.0001$, $r = 0.9817$, **Figure 33**) confirmant les résultats obtenus en cytométrie et en Western Blot.

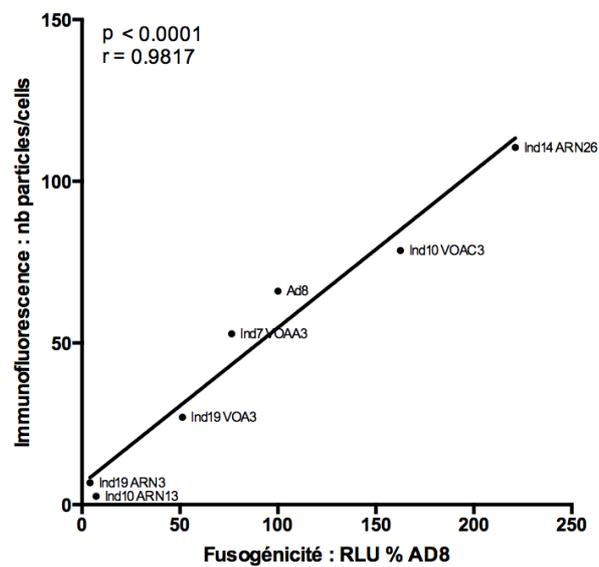


Figure 33. Déficit d'expression extracellulaire des enveloppes du réservoir VIH-1.

Corrélation de Pearson entre l'immunofluorescence des enveloppes des HeLa 273 Tat transfectées par les plasmides pCGCG Env NL-AD8, individu 10 VOA C3, individu 7 VOA A3, individu 14 ARN 26, individu 10 ARN 13 reconnues par les bNAbs et leur fusogénicité mesurée par le test de fusion cellule-cellule effectué sur des HeLa TZM.bl mises en co-culture avec des HeLa Tat transfectées par pCGCG EnvR.

Discussion & Perspectives

I. Discussion

L'obstacle majeur pour une guérison de l'infection par le VIH est le rebond virémique observé chez la plupart des individus qui arrêtent leur traitement antirétroviral. Ce rebond virémique est permis par la production de virions *de novo* à partir de provirus intégrés dans les génomes de cellules, infectées de manière latente, représentées majoritairement par les lymphocytes T CD4⁺ mémoires quiescents (Chun et al., 1997b, 1998; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997). Ces provirus latents représentent le principal réservoir VIH-1 chez les individus sous cART étant donné que seule une minorité subsiste sous forme latente dans d'autres types cellulaires ou sous forme répliquative dans certains sanctuaires pharmacologiques (cf. II.A).

La très vaste majorité des génomes viraux intégrés latents des LT CD4⁺ quiescents présente des délétions et des mutations dont de nombreuses hypermutations (Bruner et al., 2016; Ho et al., 2013). L'instabilité intrinsèque du processus de transcription inverse est à l'origine des délétions (Pulsinelli and Temin, 1991, 1994; Suo and Johnson, 1997; Tsuchihashi and Brown, 1994). Quant aux hypermutations, elles sont l'œuvre d'un facteur de restriction cellulaire nommé APOBEC3G normalement inhibé par la protéine virale Vif qui induit sa dégradation par le protéasome (Harris et al., 2003; Lecossier et al., 2003; Sheehy et al., 2003). L'accumulation de mutations et de délétions au sein des provirus se met en place rapidement après l'infection. Après plusieurs années de traitement, les provirus non intacts représentent la très large majorité du réservoir viral (Bruner et al., 2016). L'accumulation de génomes défectifs au sein du réservoir viral durant l'infection sous trithérapie montre qu'une sélection de ces séquences génétiquement altérées se met en place. Ce processus reste encore mal décrit et expliqué. Les séquences génétiquement défectives sont incapables de produire des protéines fonctionnelles et ainsi naturellement ces cellules échappent aux effets cytopathiques de la production de protéines virales et à la réponse immunitaire qu'elle soit humorale ou cellulaire. Ainsi selon ces hypothèses, l'élimination de ces cellules, infectées par des provirus intacts, serait possible uniquement si la latence est inversée et l'expression des protéines virales activée. Or l'activation de l'expression des protéines est possible après une forte stimulation antigénique ou lors des phases transitoires de prolifération homéostatique de ces cellules T mémoires (Chomont et al., 2009).

D'ailleurs, de nombreuses séquences identiques sont retrouvées dans des cellules mémoires différentes chez un même individu. Chez la plupart des sujets sous cART, la

présence d'expansions clonales de provirus VIH identiques qui sont défectifs dans la plupart des cas, mais pour certains infectieux, a été observée. Cela constitue une preuve d'expansion clonale de cellules mémoires comportant des provirus défectifs (Lorenzi et al., 2016; Maldarelli et al., 2014; Wagner et al., 2014). Incapables d'induire un effet cytopathogène et incapables d'être détectés ou détruits par l'immunité, ces provirus sont voués à persister dans les cellules T mémoires qui en sont porteuses. La nature de ces expansions clonales est encore incertaine. Certains évoquent une dérégulation de la division cellulaire due à l'intégration du VIH à proximité de gènes cellulaires régulateurs de la multiplication cellulaire (Wagner et al., 2014) D'autres considèrent que ces clones proviraux ne font que refléter la nature proliférative de l'homéostasie des cellules T.

Dans la perspective d'une guérison de l'infection par le VIH, ces génomes viraux totalement défectifs n'importent probablement pas car ils sont incapables de produire du virus. Ils ne seront que les marques cicatricielles de l'infection. Il en est tout autrement des cellules porteuses de provirus VIH apparemment intacts, au sein desquels il faut compter les provirus à l'origine de la charge virale résiduelle très basse constamment observée chez les individus sous antirétroviraux, ainsi que le rebond virologique associé à l'interruption des traitements. Dans mon travail de thèse basé sur l'étude des glycoprotéines d'enveloppe, j'ai montré l'existence d'une population de génomes viraux porteurs de défauts fonctionnels, au sein de ces provirus intacts.

Dans ce contexte, la persistance de provirus infectieux au sein du réservoir viral peut s'expliquer par différents mécanismes non exhaustifs mais complémentaires. Le premier d'entre eux concerne la prolifération homéostatique de cellules sans réactivation importante de l'expression des protéines virales, ou tout simplement l'absence de réactivation de certains clones lymphocytaires durant de nombreuses années. La seconde explication serait la compensation de la perte de certains clones par l'ampleur de la prolifération clonale des cellules mémoires (Wiegand et al., 2017). L'expansion clonale est en effet observée majoritairement pour les séquences comportant des délétions ou mutations mais aussi pour les séquences intactes. La troisième option est que certaines séquences apparemment intactes ne présentant aucune marque génétique telles que les délétions de plus de 50 pb ou provoquant des décalages du cadre de lecture ou des mutations et des hypermutations non silencieuses dans des régions très conservées soient en fait des séquences incapables de produire des protéines stables et fonctionnelles. Ces séquences *env* apparemment intactes ne

peuvent donc pas induire une cytopathogénèse ou être la cible d'une réponse immunitaire efficace. Notre étude examinant la fonctionnalité et l'expression des enveloppes génétiquement intactes démontre essentiellement ce dernier mécanisme (cf. Figure 34).

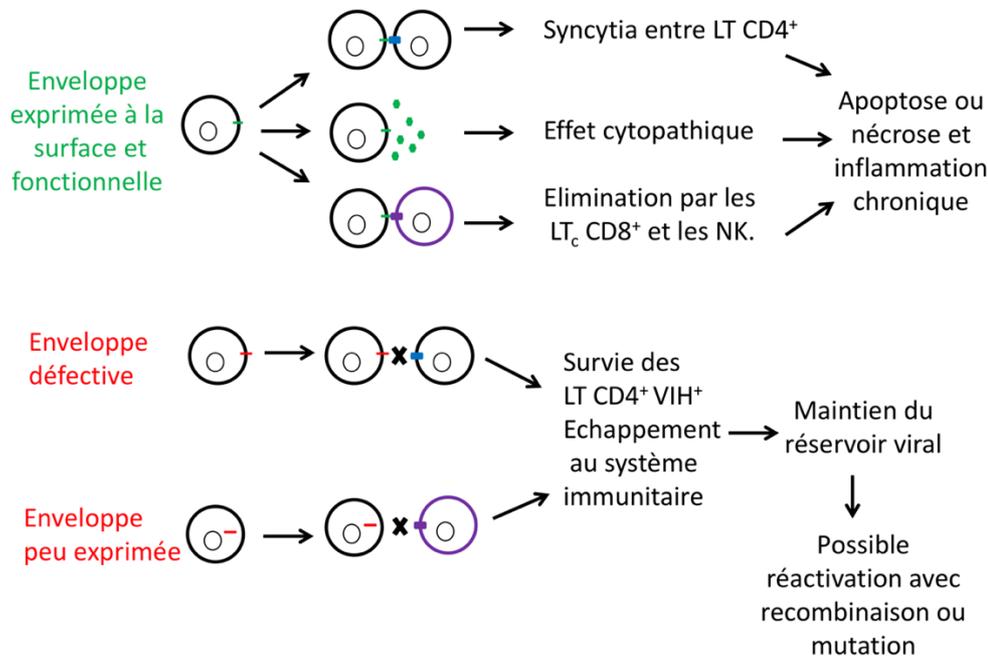


Figure 34. Schéma du rôle potentiel des enveloppes fonctionnelles versus enveloppes peu exprimées ou peu fonctionnelles du réservoir VIH-1 sur l'infection sous cART.

Des études publiées précédemment ont montré qu'il y avait un décalage important entre le nombre de séquences intactes par million de cellules et le nombre d'unités virales infectieuses par million de cellules, observées lors des co-cultures stimulant les LT CD4+ mémoires quiescents permettant une réplication virale quantitative (qVOA) (Ho et al., 2013). Ces études indiquent que ces génomes intacts qui ne conduisent pas à la détection de virions pouvant émerger lors du qVOA sont en fait infectieux après reconstruction, clonage et expression. Leurs résultats suggèrent fortement que l'émergence de virus suite à une stimulation *in vitro* serait un événement stochastique. Une étude, présentée par A. Ciuffi au congrès « *HIV persistence 2017* », montre qu'il y a plusieurs états de latence plus ou moins profonde (**Figure 35**). Les activations stochastiques observées dans l'étude de Ho *et al.* sont peut être dues à ces états de latence variables. La différence de quantification entre les génomes intacts et les virus émergeant après réactivation peut aussi en partie s'expliquer par

la stabilité et la fonctionnalité des glycoprotéines d'enveloppe (**Figure 35**). En effet, dans notre étude, 27% des séquences *env* dérivées d'ARNm et de qVOA de quatre individus, apparemment intactes codent en réalité pour des enveloppes peu (< 25% de l'enveloppe contrôle NL-AD8) voire non fonctionnelles. Aucune séquence ne présente des délétions importantes. Les séquences hypermutées et celles comportant des codons stop prématurés ont été exclues pour les tests de fonctionnalité à savoir les tests de fusion cellule-cellule et d'infectivité de pseudo-particules. Ces résultats sont concordants avec le fait que l'expression des ARNm Env entiers nécessite celle de séquences en *cis* et en *trans* au sein de la séquence *env* comme celle codant la protéine virale d'export nucléaire Rev. En outre, l'expression de la protéine Env nécessite la bonne combinaison nucléotidique des signaux d'excision et d'épissage. L'expression d'ARNm Env corrects suggère la présence de provirus latents relativement intègres.

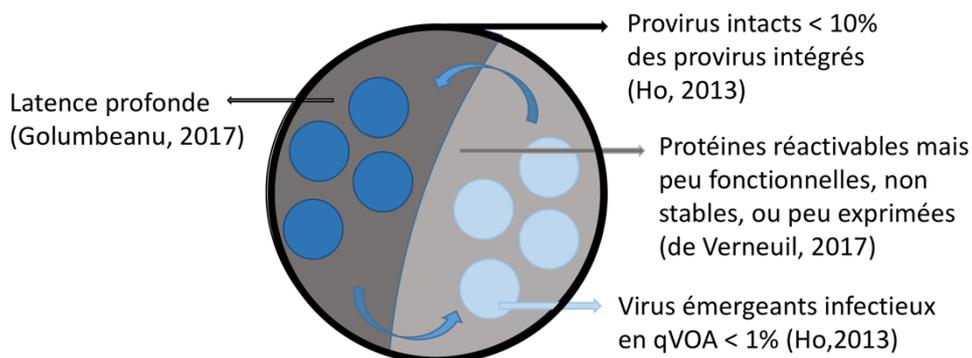


Figure 35. Quantification du réservoir VIH-1 fonctionnel parmi le réservoir VIH-1 "intact".

Le grand cercle noir représente toutes les séquences ne présentant pas de mutation, ni de délétions. Parmi elles, certaines conduisent à l'expression de protéines permettant le bourgeonnement de virus répliquatif quantifiable en VOA. Les petits ronds bleus représentent les séquences réactivables par différents LRA selon leur niveau de latence. Et le reste en gris représente les séquences codant pour des protéines virales ne permettant pas la production de virus ayant une aptitude à se répliquer suffisamment pour se propager en VOA car elles sont peu exprimées ou peu fonctionnelles.

D'après les résultats que j'ai obtenus lors des tests de fusion cellule-cellule, concordant avec ceux d'infectivité, les enveloppes du réservoir VIH-1 dont les séquences nucléotidiques paraissent intactes ne sont pas toutes fonctionnelles. Ces défauts de fonctionnalité sont corrélés à des défauts d'expression observés par cytométrie de flux, par Western Blot et par immunofluorescence. En effet, les enveloppes présentant une fusogénicité inférieure à 25 % de celle de l'enveloppe du virus contrôle NL-AD8, sont au minimum 4 fois moins exprimées

que l'enveloppe contrôle. Concernant les défauts ayant pu altérer l'enveloppe, nos résultats mettent en lumière le fait qu'ils affecteraient plutôt la traduction, la stabilité, la maturation, la glycosylation, le transport et plus généralement la conformation des enveloppes que leur capacité de reconnaissance des récepteurs CD4 et des corécepteurs ainsi que leurs domaines conformationnels impliqués dans le processus de fusion. Au niveau de l'expression des enveloppes, il serait intéressant d'étudier leur capacité de fixer les adaptines pour savoir si des erreurs d'adressage entre les endosomes et la membrane plasmique (développé dans l'introduction Cf. III.B) pourraient être à l'origine des défauts d'expression observés ici. Pour étudier leur stabilité, il serait intéressant de regarder si elles sont envoyées aux protéasomes ou dirigées vers des lysosomes. Seule une enveloppe, celle dérivée du virus 1 du VOA de l'individu 19, semble affectée principalement dans sa capacité de fusion car son expression mesurée par Western Blot et cytométrie apparaît bien supérieure à sa fonctionnalité mesurée lors des tests de fusion cellule-cellule.

Des différences notables d'expression de protéines d'enveloppes fonctionnelles sont observables en fonction du nombre d'années sous trithérapie. En effet, l'individu 14 qui a été traité dans l'année de son infection et depuis seulement 4 ans présente des enveloppes très fonctionnelles alors qu'à l'opposé l'individu 19 qui a été traité efficacement longtemps après son infection et qui est sous traitement depuis plus de 12 ans ne présente que des enveloppes dont la capacité fonctionnelle est bien inférieure au contrôle NL-AD8. Dans cette même logique, les individus 7 et 10 qui ont des historiques de traitement intermédiaires, présentent des enveloppes de réservoir très fonctionnelles comme pas du tout. Il serait intéressant de prolonger cette étude avec d'autres individus pour pouvoir affirmer l'effet des ART sur la composition du réservoir VIH-1.

Au total, le principal défaut des gènes *env* transcrits dans les cellules T mémoires réactivées de patients traités consiste en une incapacité d'exprimer un niveau suffisant de protéine Env. Les mécanismes n'ont pas été explorés en profondeur dans ce travail. Toutefois, il nous apparaît que la nature de ce défaut est parfaitement compatible avec un mécanisme de sélection fondé sur l'expression, l'effet cytopathogène et l'immunogénicité des glycoprotéines d'enveloppe. Cette observation renforce notre hypothèse centrale d'une dynamique permanente de sélection en faveur de provirus résilients à l'effet cytopathogène mais surtout à l'immunité, au cours de l'histoire de l'infection et du traitement.

Les qVOA sous-estiment le réservoir viral fonctionnel et la quantification des génomes intacts le surestime. Ainsi, pour mesurer la vraie taille du réservoir viral fonctionnel, il convient de regarder et d'analyser la fonctionnalité des protéines d'enveloppes mais aussi des autres protéines virales. Il serait notamment intéressant d'étudier la fonctionnalité de Rev car sans elle toutes les protéines codées par les ARN mono ou non épissés ne seraient pas synthétisées.

II. Perspectives

Les défauts d'expression des enveloppes du réservoir viral impactant leur activité de fusion et celle de l'infectivité des virions ont différentes conséquences sur les stratégies de traitement.

Une des stratégies possibles vise à éliminer les cellules du réservoir VIH-1 par la méthode « *shock and kill* » mais elle est confrontée à différentes limites. Tout d'abord, les LRA sont toxiques pour toutes les cellules l'organisme à long terme. En effet, les LRA agissent directement sur des facteurs cellulaires d'activation, donc ils ne peuvent pas faire l'objet d'un traitement trop long. C'est pourquoi on parle d'un « *shock* ». De plus, les LRA seuls n'ont que peu d'action sur la taille du réservoir VIH-1 (Archin et al., 2008, 2010; Clutton et al., 2016; Lehrman et al., 2005; Mota et al., 2017; Rasmussen and Lewin, 2016; Routy et al., 2012; Sogaard et al., 2015). En effet, pour parvenir à réduire efficacement la taille du réservoir VIH-1, les cellules de l'immunité doivent subir en parallèle une stimulation. L'enveloppe virale joue un rôle clé dans l'étape de reconnaissance et d'élimination des cellules du réservoir VIH-1, car exprimée à la surface ou présentée sur le CMH de classe I, elle est reconnue respectivement par les anticorps et les TCR. L'observation faite dans mes travaux restreint le potentiel de ce mécanisme pour certaines enveloppes car elles sont peu voire non exprimées rendant impossible l'élimination des cellules les produisant au moment du « *shock* ». Or celles qui échappent au système immunitaire pourraient perdurer malgré le « *shock and kill* » et il subsisterait alors, au sein de l'organisme, des cellules porteuses de génomes viraux défectueux mais réactivables et modifiables par mutations spontanées ou recombinaisons.

En effet, parmi les enveloppes qui apparaissent peu fonctionnelles et/ou peu exprimées qui n'auront pas pu être éliminées avec les stratégies « *shock and kill* », certaines pourront tout de même initier des cycles de réplication. L'histoire de la lutte contre le VIH nous a appris à être modestes. Nous savons à quel point le VIH est capable de s'adapter rapidement à toute pression sélective exercée sur lui, et cela risque d'être aussi le cas du réservoir VIH-1. Il faut s'attendre à ce que, lors d'une interruption de traitement, même si on a l'impression d'avoir éradiqué l'ensemble des populations virales infectieuses, le VIH reconstitue des virions infectieux à partir de génomes partiellement défectifs. Deux mécanismes sont bien connus comme étant capable d'effectuer ces corrections : la survenue de mutations compensatrices,

et la recombinaison. La transcriptase inverse du VIH est peu fidèle et ne possède pas d'activité correctrice. Ainsi le génome VIH pourra subir rapidement des mutations lors des premiers cycles de réplication (Moradigaravand et al., 2014; Mostowy et al., 2011; Onafuwa-Nuga and Telesnitsky, 2009; Robertson et al., 1995). Ces changements nucléotidiques permettront aux enveloppes d'être modifiées et sélectionnées pour être à nouveau fonctionnelles et très exprimées comme le sont celles des virus à forte capacité de réplication caractéristique du rebond viral. Le mécanisme de recombinaison paraît le plus redoutable. En effet, la co-infection par des génomes présentant des défauts de réplication ou la fusion de cellules porteuses de génomes défectifs mais complémentaires phénotypiquement, pourront conduire, après arrêt du traitement, à la production de virions hétérozygotes dont les génomes seront capables de recombiner et de donner lieu à des virus parfaitement intègres et infectieux. Deux phénomènes de recombinaison peuvent avoir lieu : entre les deux ARN d'un même virus infectant une cellule (Rhodes et al., 2003) ou entre ARN de différents virus infectant une même cellule (Gratton et al., 2000; Jung et al., 2002). Par exemple pour étudier ce dernier phénomène de recombinaison, il serait intéressant de co-infecter des LT CD4⁺ de donneurs sains avec deux enveloppes peu exprimées ou peu fonctionnelles et séquencer à nouveau le ou les génome(s) viraux après plusieurs passages *ex vivo*. Il est donc important de déterminer si ces enveloppes, après mutations ou recombinaisons entre elles, sont capables de conduire à une protéine fonctionnelle et donc potentiellement à un virus de rebond. Déterminer si ces modifications peuvent avoir lieu permettra de savoir s'il y a un intérêt à réactiver le réservoir VIH-1 sur une longue période ou non.

Dans le cas où ces modifications peuvent avoir lieu facilement, il faudrait traiter longtemps les individus avec des LRA et donc pour cela, induire l'expression des LRA uniquement dans les cellules du réservoir VIH-1. Il serait ainsi intéressant de modifier légèrement la première stratégie. En effet, maintenir la réactivation de l'expression des protéines virales immunogènes comme l'enveloppe uniquement dans les cellules du réservoir permettrait de favoriser les recombinaisons des génomes partiellement défectueux et ainsi d'éliminer petit à petit le réservoir VIH-1, tout en empêchant la réplication virale par cART (« *block with ART, tickle and kill slowly* ») Ceci pourrait pallier le souci causé par ces enveloppes peu exprimées et peu fonctionnelles. Pour pallier la toxicité des LRA, de nouvelles stratégies visant à induire leur expression par des vecteurs Rev dépendants ou Tat dépendants sont en étude (Wu, OP8.5, *HIV Persistence*, 2017). En outre, pour exprimer les LRA uniquement dans les cellules du

réservoir, la recherche de marqueurs pour les cibler, initiée par la découverte de CD32A doit être encouragée (Descours et al., 2017; Martin et al., 2017; Osuna et al., 2017; Serra-Peinado et al., 2017).

D'ailleurs, le fait que la plupart des enveloppes du réservoir VIH-1 d'individus traités depuis plus de 4 ans comportent des mutations, des délétions ou soient peu fonctionnelles montre qu'une sélection négative a déjà lieu *in vivo* sous traitement. Renforcer cette sélection négative pourrait permettre d'éliminer plus vite le réservoir VIH-1. Cette sélection négative a lieu notamment *via* les glycoprotéines d'enveloppe virale par deux phénomènes distincts : l'élimination des cellules exposant l'enveloppe à leur surface après reconnaissance par le TCR et les anticorps, ou l'élimination des cellules exprimant une enveloppe cytopathogène. Pour ce dernier processus, comme décrit dans le paragraphe III.E, l'enveloppe agit comme un agent cytopathogène lors de son expression au niveau du RER, et de la membrane plasmique en perturbant cette dernière, et lors de l'hémifusion ou de la fusion avec une cellule cible. Quant au pouvoir immunogène de l'enveloppe, sa faible expression a un impact sur leur reconnaissance par des anticorps spécifiques connus pour permettre une réponse cellulaire cytotoxique anticorps dépendante (ADCC) médiée par les cellules NK (Bruel et al., 2016; Lee et al., 2015; Mujib et al., 2017a) et pour leur reconnaissance par les TCR des LT CD8⁺ cytotoxiques (Ding et al., 2016; Mujib et al., 2017b). Dans ces deux cas, la présence de telles enveloppes pourrait empêcher la diminution de la taille du réservoir viral lors de l'activation des cellules impliquées dans l'ADCC après la réversion de la latence (Bruner et al., 2015; Deeks, 2012; Lehrman et al., 2005; Margolis et al., 2017). Les enveloppes correctement exprimées à la surface pourraient jouer ainsi un rôle important dans le « *kill* », contrairement aux enveloppes peu exprimées.

Ainsi le fait de réactiver longtemps les cellules latentes du réservoir permettrait, *via* entre autres la capacité immunogène et cytopathogène des glycoprotéines d'enveloppe, de l'éliminer de l'organisme.

En parallèle, dans la stratégie de « *shock and kill* » et dans la stratégie « *block with ART, tickle and kill slowly* », il faut absolument développer des molécules et des stratégies afin que le « *kill* » soit suffisamment efficace pour que l'immunité prenne le dessus sur le virus. Par exemple, l'élimination des cellules exprimant l'enveloppe par le système immunitaire peut être renforcée par une molécule DART ciblant l'enveloppe nommée MGD014 qui agit comme

un anticorps non neutralisant (Nordstrom, OP7.6, *HIV Persistence*, 2017). En combinaison pour renforcer le « *kill* », il est aussi important d'induire la production ou d'injecter des anticorps à large spectre neutralisants (Ren, OP 5.6, Lorenzi OP 6.5, *HIV Persistence*, 2017, (Davis-Gardner et al., 2017)). De plus, l'inoculation de lymphocytes T CD4⁺ génétiquement modifiés pour exprimer le CCR5 muté (Haworth et al., 2017) pourrait favoriser le bon rétablissement du système immunitaire nécessaire pour éliminer les cellules infectées exprimant l'enveloppe virale. Par ailleurs, un inhibiteur de la protéine Bcl-2 impliquée dans les voies anti-apoptotiques, permet de lever en partie la résistance des LT CD4⁺ aux CTL, observée jusqu'à présent dans les stratégies « *shock and kill* » (Huang, OP 5.4 *HIV Persistence*, 2017).

En outre, dans certains compartiments isolés en particulier le système nerveux central, les ART comme les LRA passent difficilement certaines barrières physiologiques et donc ne peuvent pas atteindre toutes les cellules infectées. Il faudrait ainsi prolonger l'étude et caractériser les enveloppes de cellules « réservoirs » du SNC de modèles simiens comme les macrophages pour savoir s'il faut aussi les éliminer (Mangus et al., 2018). De plus, il serait intéressant d'étudier les enveloppes des expansions clonales observées dans les ganglions lymphatiques car dans ce compartiment, le réservoir viral diminue sous cART mais le nombre d'expansions clonales augmente (Lee OP2.5, VanBelzen OP6.2, *HIV Persistence* 2017). L'étude de la fonctionnalité des enveloppes des expansions clonales permettrait de savoir si leur augmentation au cours du temps sous cART est impliquée dans la sélection négative des enveloppes. Surtout l'étude de la capacité de ces expansions clonales défectueuses à pouvoir recombiner est absolument nécessaire pour mieux appréhender les stratégies d'éradication.

Cependant, activer le système immunitaire pour éliminer les cellules du réservoir VIH-1 implique de favoriser l'inflammation, or cette dernière participe de manière chronique à l'épuisement des LT CD4⁺ et donc à l'avancée vers le stade SIDA (Baker et al., 2017; Morieri et al., 2018; Tien et al., 2010). Ainsi dans les stratégies renforçant le « *kill* », il est nécessaire de surveiller l'inflammation. Pour éviter ce phénomène d'inflammation, une stratégie visant à maintenir la latence se développe (« *Block and lock* »). Cette autre stratégie qui vise à contrôler le réservoir VIH-1, c'est à dire à limiter sa réactivation, permettrait ainsi d'éviter l'expression de ces enveloppes immunogènes. Pour cela, l'expression des gènes viraux doit être réprimée. Comme la latence implique des protéines cellulaires en plus de certaines

protéines virales, il est nécessaire de rester prudent pour ne pas affecter l'expression dans les cellules autres que celles du réservoir. C'est pourquoi de plus en plus de recherches sont menées sur les cibles virales potentiellement impliquées dans la latence. Par exemple, un ARN antisens codé par le génome viral participe au maintien de la latence par le recrutement d'un complexe répresseur de transcription PRC2 qui permet la triméthylation des histone H3 au niveau du promoteur LTR5' (Zapata et al., 2017). Cibler et activer cet ARN permettrait de verrouiller la latence sans affecter l'état de condensation des gènes cellulaires. Quant à la dCA, décrite en introduction, son pouvoir inhibiteur sur Tat est très prometteur pour bloquer la latence virale (Kessing et al., 2017; Mousseau et al., 2012).

En outre, le Maraviroc® inhibe la fusion mais pas l'effet cytopathogène de l'enveloppe et n'empêcherait donc pas une inflammation. Bien qu'une étude récente *in vivo* montre que le Maraviroc® n'a pas d'effet sur l'état inflammatoire du SNC (Barber et al., 2017), et qu'une analyse des séquences des provirus du réservoir VIH-1 d'individus traités *versus* non traités ne présente aucune différence notable (Chaillon et al., 2017), il serait intéressant d'étudier la fonctionnalité, le pouvoir cytopathogène et l'expression des enveloppes codées par ces provirus.

Ainsi une balance à équilibrer subsiste et reste à étudier entre verrouiller la latence ou renforcer l'élimination des cellules du réservoir VIH-1.

Conclusion

L'étude de l'expression et de la fonctionnalité des glycoprotéines d'enveloppes du réservoir VIH-1 des LT CD4⁺ quiescents a permis de révéler deux phénomènes distincts. Le premier concerne l'écart de quantification entre les séquences intactes du réservoir VIH-1 et la quantification des virus réactivables. Nos résultats démontrent que cette différence serait due entre autres à des défauts d'expressions et de fonctionnalité des glycoprotéines d'enveloppe observées chez quatre individus sous cART depuis plus de quatre ans. Les glycoprotéines d'enveloppe étudiées dans cette thèse, étant issues d'ARNm viraux associées aux LT CD4⁺ quiescents réactivés par des billes anti-CD3-CD28 et de virus de qVOA, sont représentatives du réservoir VIH-1 potentiellement fonctionnel car les séquences sélectionnées pour les tests sont génétiquement intactes. Cependant parmi elles, certaines ne sont pas correctement exprimées. Le deuxième phénomène exploré dans cette thèse concerne la sélection de génomes défectueux au sein du réservoir viral. Ce mécanisme de sélection serait notamment dû à l'action cytopathogène et immunogène de l'enveloppe. En effet, la glycoprotéine d'enveloppe du VIH est une protéine virale qui par son expression intracellulaire et membranaire est capable d'induire l'apoptose de la cellule l'exprimant et de celle de la cellule avec laquelle elle fusionne. En outre, c'est une des protéines virales contre laquelle de très nombreux anticorps et TCR sont dirigés afin de permettre aux cellules immunitaires cytotoxiques telles que les LT CD8⁺ et les cellules NK d'éliminer les cellules infectées et les virus. Ce dernier phénomène n'est pas à négliger car il pourrait être impliqué dans l'inflammation chronique observée chez les individus sous cART. De plus, les quelques enveloppes qui ne sont pas assez exprimées ou fonctionnelles et qui échappent à cette sélection pourrait être un frein dans les stratégies actuelles de « *shock and kill* » si des phénomènes de mutations spontanées ou de recombinaisons ont lieu sur de telles enveloppes virales. Pour pallier cet échappement, l'inoculation d'anticorps à large spectre pourrait être envisageable, en effet dans nos expériences aussi bien en Western Blot, en cytométrie, qu'en immunofluorescence, les enveloppes même les moins exprimées et fonctionnelles sont reconnues par les bNAbs. Afin d'éradiquer le VIH de l'organisme, c'est-à-dire d'éliminer le réservoir viral des individus sous cART, il est donc important d'étudier l'expression, la fonctionnalité ainsi que l'immunogénicité des enveloppes du réservoir VIH-1 des lymphocytes T CD4⁺ mais aussi de tous les autres réservoirs cellulaires potentiels du VIH1, latents comme répliatifs.

Références bibliographiques

- Abreu, C.M., Price, S.L., Shirk, E.N., Cunha, R.D., Pianowski, L.F., Clements, J.E., Tanuri, A., and Gama, L. (2014). Dual role of novel ingenol derivatives from *Euphorbia tirucalli* in HIV replication: inhibition of de novo infection and activation of viral LTR. *PLoS ONE* *9*, e97257.
- Ackerman, M.E., Mikhailova, A., Brown, E.P., Dowell, K.G., Walker, B.D., Bailey-Kellogg, C., Suscovich, T.J., and Alter, G. (2016). Polyfunctional HIV-Specific Antibody Responses Are Associated with Spontaneous HIV Control. *PLoS Pathog.* *12*, e1005315.
- Agostini, I., Navarro, J.M., Rey, F., Bouhamdan, M., Spire, B., Vigne, R., and Sire, J. (1996). The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIB. *J. Mol. Biol.* *261*, 599–606.
- Ahmad, N., and Venkatesan, S. (1988). Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* *241*, 1481–1485.
- Akari, H., Fukumori, T., and Adachi, A. (2000). Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 gp41 cytoplasmic tail for Env incorporation into virions. *J. Virol.* *74*, 4891–4893.
- Aladdin, H., Katzenstein, T., Dreves, A.-M., Ryder, L., Gerstoft, J., Skinhøj, P., Pedersen, B.K., and Ullum, H. (2003). T-cell receptor excisional circles, telomere length, proliferation and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus-infected individuals after 18 months of treatment induced viral suppression. *Scand. J. Immunol.* *57*, 485–492.
- Albert, J., Abrahamsson, B., Nagy, K., Aurelius, E., Gaines, H., Nyström, G., and Fenyö, E.M. (1990). Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV-1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. *AIDS* *4*, 107–112.
- Aldrich, J. (1997). R.A. Fisher and the making of maximum likelihood 1912-1922. *Statist. Sci.* *12*, 162–176.
- Aleman, S., Söderbärg, K., Visco-Comandini, U., Sitbon, G., and Sönnnerborg, A. (2002). Drug resistance at low viraemia in HIV-1-infected patients with antiretroviral combination therapy. *AIDS* *16*, 1039–1044.
- Allan, J.S., Coligan, J.E., Barin, F., McLane, M.F., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Lee, T.H., and Essex, M. (1985). Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* *228*, 1091–1094.
- Almeida, A.R., Borghans, J.A., and Freitas, A.A. (2001). T cell homeostasis: thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors. *J. Exp. Med.* *194*, 591–599.
- Anderson, J.M. (2000). Multinucleated giant cells. *Curr. Opin. Hematol.* *7*, 40–47.
- Andreau, K., Perfettini, J.-L., Castedo, M., Métivier, D., Scott, V., Pierron, G., and Kroemer, G. (2004a). Contagious apoptosis facilitated by the HIV-1 envelope: fusion-induced cell-to-cell transmission of a lethal signal. *J. Cell. Sci.* *117*, 5643–5653.
- Andreau, K., Castedo, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., Pichart, E., Souquere, S., Vivet, S., Larochette, N., and Kroemer, G. (2004b). Preapoptotic chromatin condensation upstream of the mitochondrial checkpoint. *J. Biol. Chem.* *279*, 55937–55945.
- Aoki, S., Watanabe, Y., Sanagawa, M., Setiawan, A., Kotoku, N., and Kobayashi, M. (2006). Cortistatins A, B, C, and D, anti-angiogenic steroidal alkaloids, from the marine sponge *Corticium simplex*. *J. Am. Chem. Soc.* *128*, 3148–3149.
- Apolloni, A., Hooker, C.W., Mak, J., and Harrich, D. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 protease regulation of tat activity is essential for efficient reverse transcription and replication. *J. Virol.* *77*, 9912–9921.

- Archin, N.M., Eron, J.J., Palmer, S., Hartmann-Duff, A., Martinson, J.A., Wiegand, A., Bandarenko, N., Schmitz, J.L., Bosch, R.J., Landay, A.L., et al. (2008). Valproic acid without intensified antiviral therapy has limited impact on persistent HIV infection of resting CD4+ T cells. *AIDS* 22, 1131–1135.
- Archin, N.M., Cheema, M., Parker, D., Wiegand, A., Bosch, R.J., Coffin, J.M., Eron, J., Cohen, M., and Margolis, D.M. (2010). Antiretroviral intensification and valproic acid lack sustained effect on residual HIV-1 viremia or resting CD4+ cell infection. *PLoS ONE* 5, e9390.
- Archin, N.M., Liberty, A.L., Kashuba, A.D., Choudhary, S.K., Kuruc, J.D., Crooks, A.M., Parker, D.C., Anderson, E.M., Kearney, M.F., Strain, M.C., et al. (2012). Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 487, 482–485.
- Arrigo, S.J., Weitsman, S., Zack, J.A., and Chen, I.S. (1990). Characterization and expression of novel singly spliced RNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 64, 4585–4588.
- Ashkenazi, A., Viard, M., Wexler-Cohen, Y., Blumenthal, R., and Shai, Y. (2011). Viral envelope protein folding and membrane hemifusion are enhanced by the conserved loop region of HIV-1 gp41. *FASEB J.* 25, 2156–2166.
- Ayala, V.I., Trivett, M.T., Barsov, E.V., Jain, S., Piatak, M., Trubey, C.M., Alvord, W.G., Chertova, E., Roser, J.D., Smedley, J., et al. (2016). Adoptive Transfer of Engineered Rhesus Simian Immunodeficiency Virus-Specific CD8+ T Cells Reduces the Number of Transmitted/Founder Viruses Established in Rhesus Macaques. *J. Virol.* 90, 9942–9952.
- Bailey, J.R., Sedaghat, A.R., Kieffer, T., Brennan, T., Lee, P.K., Wind-Rotolo, M., Haggerty, C.M., Kamireddi, A.R., Liu, Y., Lee, J., et al. (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, 6441–6457.
- Baker, J.V., Sharma, S., Grund, B., Rupert, A., Metcalf, J.A., Schechter, M., Munderi, P., Aho, I., Emery, S., Babiker, A., et al. (2017). Systemic Inflammation, Coagulation, and Clinical Risk in the START Trial. *Open Forum Infect Dis* 4, ofx262.
- Banga, R., Procopio, F.A., Noto, A., Pollakis, G., Cavassini, M., Ohmiti, K., Corpataux, J.-M., de Leval, L., Pantaleo, G., and Perreau, M. (2016). PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat. Med.* 22, 754–761.
- Bär, S., and Alizon, M. (2004). Role of the ectodomain of the gp41 transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 in late steps of the membrane fusion process. *J. Virol.* 78, 811–820.
- Barbaro, G., Fisher, S.D., and Lipshultz, S.E. (2001). Pathogenesis of HIV-associated cardiovascular complications. *Lancet Infect Dis* 1, 115–124.
- Barber, T.J., Imaz, A., Boffito, M., Niubó, J., Pozniak, A., Fortuny, R., Alonso, J., Davies, N., Mandalia, S., Podzamczar, D., et al. (2017). CSF inflammatory markers and neurocognitive function after addition of maraviroc to monotherapy darunavir/ritonavir in stable HIV patients: the CINAMMON study. *J. Neurovirol.*
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.
- Barrett, D.M., Singh, N., Porter, D.L., Grupp, S.A., and June, C.H. (2014). Chimeric antigen

- receptor therapy for cancer. *Annu. Rev. Med.* *65*, 333–347.
- Battivelli, E., Dahabieh, M.S., Abdel-Mohsen, M., Svensson, P., Tojal Da Silva, I., Cohn, L., Gramatica, A., Deeks, S., Greene, W., Nussenzweig, M.C., et al. (2017). HIV-1 integration sites reveal heterogeneity in the latent population and explain the limited induction of latent proviruses. *IAS*.
- Baur, A.S., Sawai, E.T., Dazin, P., Fantl, W.J., Cheng-Mayer, C., and Peterlin, B.M. (1994). HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity* *1*, 373–384.
- Beans, E.J., Fournogerakis, D., Gauntlett, C., Heumann, L.V., Kramer, R., Marsden, M.D., Murray, D., Chun, T.-W., Zack, J.A., and Wender, P.A. (2013). Highly potent, synthetically accessible prostratin analogs induce latent HIV expression in vitro and ex vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 11698–11703.
- Beary, T.P., Tencza, S.B., Mietzner, T.A., and Montelaro, R.C. (1998). Interruption of T-cell signal transduction by lentivirus lytic peptides from HIV-1 transmembrane protein. *J. Pept. Res.* *51*, 75–79.
- Bedoya, L.M., Abad, M.J., Calonge, E., Saavedra, L.A., Gutierrez C, M., Kouznetsov, V.V., Alcami, J., and Bermejo, P. (2010). Quinoline-based compounds as modulators of HIV transcription through NF-kappaB and Sp1 inhibition. *Antiviral Res.* *87*, 338–344.
- Beerenwinkel, N., Däumer, M., Oette, M., Korn, K., Hoffmann, D., Kaiser, R., Lengauer, T., Selbig, J., and Walter, H. (2003). Geno2pheno: estimating phenotypic drug resistance from HIV-1 genotypes. *Nucleic Acids Res* *31*, 3850–3855.
- Bergeron, L., Sullivan, N., and Sodroski, J. (1992). Target cell-specific determinants of membrane fusion within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 third variable region and gp41 amino terminus. *J. Virol.* *66*, 2389–2397.
- Berkhout, B., Silverman, R.H., and Jeang, K.T. (1989). Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* *59*, 273–282.
- Berlioz-Torrent, C., Shacklett, B.L., Erdtmann, L., Delamarre, L., Bouchaert, I., Sonigo, P., Dokhelar, M.C., and Benarous, R. (1999). Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J. Virol.* *73*, 1350–1361.
- Berndt, C., Möpps, B., Angermüller, S., Gierschik, P., and Krammer, P.H. (1998). CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4(+) T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 12556–12561.
- Beyrer, C., and Pozniak, A. (2017). HIV Drug Resistance — An Emerging Threat to Epidemic Control. *New England Journal of Medicine* *377*, 1605–1607.
- Biti, R., Ffrench, R., Young, J., Bennetts, B., Stewart, G., and Liang, T. (1997). HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat. Med.* *3*, 252–253.
- Blanco, J., Jacotot, E., Cabrera, C., Cardona, A., Clotet, B., De Clercq, E., and Esté, J.A. (1999). The implication of the chemokine receptor CXCR4 in HIV-1 envelope protein-induced apoptosis is independent of the G protein-mediated signalling. *AIDS* *13*, 909–917.
- Blanco, J., Barretina, J., Ferri, K.F., Jacotot, E., Gutiérrez, A., Armand-Ugón, M., Cabrera, C., Kroemer, G., Clotet, B., and Esté, J.A. (2003). Cell-surface-expressed HIV-1 envelope induces the death of CD4 T cells during GP41-mediated hemifusion-like events. *Virology* *305*, 318–329.
- Blanco, J., Barretina, J., Clotet, B., and Esté, J.A. (2004). R5 HIV gp120-mediated cellular contacts induce the death of single CCR5-expressing CD4 T cells by a gp41-dependent

- mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 76, 804–811.
- Blazkova, J., Murray, D., Justement, J.S., Funk, E.K., Nelson, A.K., Moir, S., Chun, T.-W., and Fauci, A.S. (2012). Paucity of HIV DNA methylation in latently infected, resting CD4+ T cells from infected individuals receiving antiretroviral therapy. *J. Virol.* 86, 5390–5392.
- Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer, T.A., and Mackay, C.R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 1925–1930.
- Blot, G., Janvier, K., Le Panse, S., Benarous, R., and Berlioz-Torrent, C. (2003). Targeting of the human immunodeficiency virus type 1 envelope to the trans-Golgi network through binding to TIP47 is required for env incorporation into virions and infectivity. *J. Virol.* 77, 6931–6945.
- Blot, G., Lopez-Vergès, S., Treand, C., Kubat, N.J., Delcroix-Genête, D., Emiliani, S., Benarous, R., and Berlioz-Torrent, C. (2006). Luman, a new partner of HIV-1 TMgp41, interferes with Tat-mediated transcription of the HIV-1 LTR. *J. Mol. Biol.* 364, 1034–1047.
- Blumenthal, R., Clague, M.J., Durell, S.R., and Epand, R.M. (2003). Membrane fusion. *Chem. Rev.* 103, 53–69.
- Boge, M., Wyss, S., Bonifacino, J.S., and Thali, M. (1998). A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. *J. Biol. Chem.* 273, 15773–15778.
- Bolotin, E., Annett, G., Parkman, R., and Weinberg, K. (1999). Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transplant.* 23, 783–788.
- Bosch, M.L., Earl, P.L., Fargnoli, K., Picciafuoco, S., Giombini, F., Wong-Staal, F., and Franchini, G. (1989). Identification of the fusion peptide of primate immunodeficiency viruses. *Science* 244, 694–697.
- Bouchat, S., Gatot, J.-S., Kabeya, K., Cardona, C., Colin, L., Herbein, G., De Wit, S., Clumeck, N., Lambotte, O., Rouzioux, C., et al. (2012). Histone methyltransferase inhibitors induce HIV-1 recovery in resting CD4(+) T cells from HIV-1-infected HAART-treated patients. *AIDS* 26, 1473–1482.
- Bouchat, S., Delacourt, N., Kula, A., Darcis, G., Van Driessche, B., Corazza, F., Gatot, J.-S., Melard, A., Vanhulle, C., Kabeya, K., et al. (2016). Sequential treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and deacetylase inhibitors reactivates HIV-1. *EMBO Mol Med* 8, 117–138.
- Brady, J., and Kashanchi, F. (2005). Tat gets the “green” light on transcription initiation. *Retrovirology* 2, 69.
- Briggs, J.A.G., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H.-G., and Fuller, S.D. (2003). Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* 22, 1707–1715.
- Bruel, T., Guivel-Benhassine, F., Amraoui, S., Malbec, M., Richard, L., Bourdic, K., Donahue, D.A., Lorin, V., Casartelli, N., Noël, N., et al. (2016). Elimination of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies. *Nat Commun* 7, 10844.
- Bruner, K.M., Hosmane, N.N., and Siliciano, R.F. (2015). Towards an HIV-1 cure: measuring the latent reservoir. *Trends Microbiol.* 23, 192–203.
- Bruner, K.M., Murray, A.J., Pollack, R.A., Soliman, M.G., Laskey, S.B., Capoferri, A.A., Lai, J., Strain, M.C., Lada, S.M., Hoh, R., et al. (2016). Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat. Med.* 22, 1043–1049.
- Bubien, J.K., Benveniste, E.N., and Benos, D.J. (1995). HIV-gp120 activates large-conductance apamin-sensitive potassium channels in rat astrocytes. *Am. J. Physiol.* 268, C1440-1449.
- Bukrinsky, M.I., Stanwick, T.L., Dempsey, M.P., and Stevenson, M. (1991). Quiescent T

- lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* 254, 423–427.
- Butler, K.M., Gavin, P., Coughlan, S., Rochford, A., Mc Donagh, S., Cunningham, O., Poulosom, H., Watters, S.A., and Klein, N. (2015). Rapid viral rebound after 4 years of suppressive therapy in a seronegative HIV-1 infected infant treated from birth. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 34, e48-51.
- Buzon, M.J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., Martin-Gayo, E., Leng, J., Henrich, T.J., Li, J.Z., et al. (2014). HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. *Nat. Med.* 20, 139–142.
- Byland, R., Vance, P.J., Hoxie, J.A., and Marsh, M. (2007). A conserved dileucine motif mediates clathrin and AP-2-dependent endocytosis of the HIV-1 envelope protein. *Mol. Biol. Cell* 18, 414–425.
- Camerini, D., Su, H.P., Gamez-Torre, G., Johnson, M.L., Zack, J.A., and Chen, I.S. (2000). Human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis in SCID-hu mice correlates with syncytium-inducing phenotype and viral replication. *J. Virol.* 74, 3196–3204.
- Campos, N., Myburgh, R., Garcel, A., Vautrin, A., Lapasset, L., Nadal, E.S., Mahuteau-Betzer, F., Najman, R., Fornarelli, P., Tantale, K., et al. (2015). Long lasting control of viral rebound with a new drug ABX464 targeting Rev - mediated viral RNA biogenesis. *Retrovirology* 12, 30.
- Cann, A.J., Churcher, M.J., Boyd, M., O'Brien, W., Zhao, J.Q., Zack, J., and Chen, I.S. (1992). The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism. *J. Virol.* 66, 305–309.
- Cao, J., Bergeron, L., Helseth, E., Thali, M., Repke, H., and Sodroski, J. (1993). Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 67, 2747–2755.
- Cao, J., Park, I.W., Cooper, A., and Sodroski, J. (1996). Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 70, 1340–1354.
- Castedo, M., Ferri, K.F., Blanco, J., Roumier, T., Larochette, N., Barretina, J., Amendola, A., Nardacci, R., Métivier, D., Este, J.A., et al. (2001). Human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein complex-induced apoptosis involves mammalian target of rapamycin/FKBP12-rapamycin-associated protein-mediated p53 phosphorylation. *J. Exp. Med.* 194, 1097–1110.
- Castedo, M., Roumier, T., Blanco, J., Ferri, K.F., Barretina, J., Tintignac, L.A., Andreau, K., Perfettini, J.-L., Amendola, A., Nardacci, R., et al. (2002). Sequential involvement of Cdk1, mTOR and p53 in apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *EMBO J.* 21, 4070–4080.
- Catani, M.V., Corasaniti, M.T., Navarra, M., Nisticò, G., Finazzi-Agrò, A., and Melino, G. (2000). gp120 induces cell death in human neuroblastoma cells through the CXCR4 and CCR5 chemokine receptors. *J. Neurochem.* 74, 2373–2379.
- Chaillon, A., Gianella, S., Lada, S.M., Perez-Santiago, J., Jordan, P., Ignacio, C., Karris, M., Richman, D., Mehta, S.R., Little, S.J., et al. (2017). Size, Composition, and Evolution of HIV DNA Populations during Early Antiretroviral Therapy and Intensification with Maraviroc. *J. Virol.*
- Chan, D.C., and Kim, P.S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* 93, 681–684.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., and Kim, P.S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89, 263–273.
- Chan, J.K., Bhattacharyya, D., Lassen, K.G., Ruelas, D., and Greene, W.C. (2013). Calcium/calcineurin synergizes with prostratin to promote NF- κ B dependent activation of latent HIV. *PLoS ONE* 8, e77749.

- Chang, D.D., and Sharp, P.A. (1990). Messenger RNA transport and HIV rev regulation. *Science* **249**, 614–615.
- Checkley, M.A., Luttmann, B.G., and Freed, E.O. (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J. Mol. Biol.* **410**, 582–608.
- Chen, D., Wang, H., Aweya, J.J., Chen, Y., Chen, M., Wu, X., Chen, X., Lu, J., Chen, R., and Liu, M. (2016). HMBA Enhances Prostratin-Induced Activation of Latent HIV-1 via Suppressing the Expression of Negative Feedback Regulator A20/TNFAIP3 in NF- κ B Signaling. *Biomed Res Int* **2016**, 5173205.
- Chéné, I. du, Basyuk, E., Lin, Y.-L., Triboulet, R., Knezevich, A., Chable - Bessia, C., Mettling, C., Baillat, V., Reynes, J., Corbeau, P., et al. (2007). Suv39H1 and HP1 γ are responsible for chromatin - mediated HIV - 1 transcriptional silencing and post - integration latency. *The EMBO Journal* **26**, 424–435.
- Chernomordik, L.V., and Kozlov, M.M. (2005). Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell* **123**, 375–382.
- Chernomordik, L., Chanturiya, A.N., Suss-Toby, E., Nora, E., and Zimmerberg, J. (1994). An amphipathic peptide from the C-terminal region of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein causes pore formation in membranes. *J. Virol.* **68**, 7115–7123.
- Cherrier, T., Elias, M., Jeudy, A., Gotthard, G., Le Douce, V., Hallay, H., Masson, P., Janossy, A., Candolfi, E., Rohr, O., et al. (2011). Human-Phosphate-Binding-Protein inhibits HIV-1 gene transcription and replication. *Viol. J.* **8**, 352.
- Chesebro, B., Nishio, J., Perryman, S., Cann, A., O'Brien, W., Chen, I.S., and Wehrly, K. (1991). Identification of human immunodeficiency virus envelope gene sequences influencing viral entry into CD4-positive HeLa cells, T-leukemia cells, and macrophages. *J. Virol.* **65**, 5782–5789.
- Cheutin, T., McNairn, A.J., Jenuwein, T., Gilbert, D.M., Singh, P.B., and Misteli, T. (2003). Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* **299**, 721–725.
- Chilson, O.P., and Kelly-Chilson, A.E. (1989). Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **19**, 389–396.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., and Kim, J.-S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* **31**, 230–232.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S., and Kim, J.-S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* **24**, 132–141.
- Chohan, B., Lang, D., Sagar, M., Korber, B., Lavreys, L., Richardson, B., and Overbaugh, J. (2005). Selection for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. *J. Virol.* **79**, 6528–6531.
- Choi, B., Gatti, P.J., Haislip, A.M., Fermin, C.D., and Garry, R.F. (1998). Role of potassium in human immunodeficiency virus production and cytopathic effects. *Virology* **247**, 189–199.
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.-R., Ghattas, G., Brenchley, J.M., et al. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* **15**, 893–900.
- Chun, R.F., and Jeang, K.T. (1996). Requirements for RNA polymerase II carboxyl-terminal domain for activated transcription of human retroviruses human T-cell lymphotropic virus

- I and HIV-1. *J. Biol. Chem.* **271**, 27888–27894.
- Chun, T.W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A., and Fauci, A.S. (1997a). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 13193–13197.
- Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., et al. (1997b). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**, 183–188.
- Chun, T.W., Engel, D., Berrey, M.M., Shea, T., Corey, L., and Fauci, A.S. (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**, 8869–8873.
- Chun, T.W., Davey, R.T., Ostrowski, M., Shawn Justement, J., Engel, D., Mullins, J.I., and Fauci, A.S. (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**, 757–761.
- Chun, T.-W., Murray, D., Justement, J.S., Blazkova, J., Hallahan, C.W., Fankuchen, O., Gittens, K., Benko, E., Kovacs, C., Moir, S., et al. (2014). Broadly neutralizing antibodies suppress HIV in the persistent viral reservoir. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 13151–13156.
- Chung, J., Scherer, L.J., Gu, A., Gardner, A.M., Torres-Coronado, M., Epps, E.W., Digiusto, D.L., and Rossi, J.J. (2014). Optimized lentiviral vectors for HIV gene therapy: multiplexed expression of small RNAs and inclusion of MGMT(P140K) drug resistance gene. *Mol. Ther.* **22**, 952–963.
- Cicala, C., Arthos, J., Rubbert, A., Selig, S., Wildt, K., Cohen, O.J., and Fauci, A.S. (2000). HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD4(+) T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 1178–1183.
- Clavel, F., and Hance, A.J. (2004). HIV drug resistance. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1023–1035.
- Cloyd, M.W., and Lynn, W.S. (1991). Perturbation of host-cell membrane is a primary mechanism of HIV cytopathology. *Virology* **181**, 500–511.
- Clutton, G., Xu, Y., Baldoni, P.L., Mollan, K.R., Kirchherr, J., Newhard, W., Cox, K., Kuruc, J.D., Kashuba, A., Barnard, R., et al. (2016). The differential short- and long-term effects of HIV-1 latency-reversing agents on T cell function. *Sci Rep* **6**, 30749.
- Cockerham, L.R., Hatano, H., and Deeks, S.G. (2016). Post-Treatment Controllers: Role in HIV “Cure” Research. *Curr HIV/AIDS Rep* **13**, 1–9.
- Coffin, J.M. (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**, 483–489.
- Col, E., Caron, C., Seigneurin-Berny, D., Gracia, J., Favier, A., and Khochbin, S. (2001). The histone acetyltransferase, hGCN5, interacts with and acetylates the HIV transactivator, Tat. *J. Biol. Chem.* **276**, 28179–28184.
- Comardelle, A.M., Norris, C.H., Plymale, D.R., Gatti, P.J., Choi, B., Fermin, C.D., Haislip, A.M., Tencza, S.B., Mietzner, T.A., Montelaro, R.C., et al. (1997). A synthetic peptide corresponding to the carboxy terminus of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein induces alterations in the ionic permeability of *Xenopus laevis* oocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **13**, 1525–1532.
- Cosson, P. (1996). Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J.* **15**, 5783–5788.
- Costello, R., Cerdan, C., Pavon, C., Brailly, H., Hurpin, C., Mawas, C., and Olive, D. (1993). The CD2 and CD28 adhesion molecules induce long-term autocrine proliferation of CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **23**, 608–613.

- Costin, J.M. (2007). Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Viol. J.* 4, 100.
- Coull, J.J., Romerio, F., Sun, J.M., Volker, J.L., Galvin, K.M., Davie, J.R., Shi, Y., Hansen, U., and Margolis, D.M. (2000). The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J. Virol.* 74, 6790–6799.
- Cozzi-Lepri, A., Phillips, A.N., Ruiz, L., Clotet, B., Loveday, C., Kjaer, J., Mens, H., Clumeck, N., Viksna, L., Antunes, F., et al. (2007). Evolution of drug resistance in HIV-infected patients remaining on a virologically failing combination antiretroviral therapy regimen. *AIDS* 21, 721–732.
- Cradick, T.J., Fine, E.J., Antico, C.J., and Bao, G. (2013). CRISPR/Cas9 systems targeting β -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res.* 41, 9584–9592.
- Curlin, M.E., Zioni, R., Hawes, S.E., Liu, Y., Deng, W., Gottlieb, G.S., Zhu, T., and Mullins, J.I. (2010). HIV-1 envelope subregion length variation during disease progression. *PLoS Pathog.* 6, e1001228.
- Daar, E.S., Moudgil, T., Meyer, R.D., and Ho, D.D. (1991). Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 324, 961–964.
- Daefler, S., Klotman, M.E., and Wong-Staal, F. (1990). Trans-activating rev protein of the human immunodeficiency virus 1 interacts directly and specifically with its target RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4571–4575.
- Dahl, V., Gisslen, M., Hagberg, L., Peterson, J., Shao, W., Spudich, S., Price, R.W., and Palmer, S. (2014). An example of genetically distinct HIV type 1 variants in cerebrospinal fluid and plasma during suppressive therapy. *J. Infect. Dis.* 209, 1618–1622.
- Damouche, A., Lazure, T., Avettand-Fènoël, V., Huot, N., Dejucq-Rainsford, N., Satie, A.-P., Mélard, A., David, L., Gommet, C., Ghosn, J., et al. (2015). Adipose Tissue Is a Neglected Viral Reservoir and an Inflammatory Site during Chronic HIV and SIV Infection. *PLoS Pathog.* 11, e1005153.
- Danner, S.A., Carr, A., Leonard, J.M., Lehman, L.M., Gudiol, F., Gonzales, J., Raventos, A., Rubio, R., Bouza, E., and Pintado, V. (1995). A short-term study of the safety, pharmacokinetics, and efficacy of zidovudine, an inhibitor of HIV-1 protease. European-Australian Collaborative Zidovudine Study Group. *N. Engl. J. Med.* 333, 1528–1533.
- Darbinian, N., Gomberg, R., Mullen, L., Garcia, S., White, M.K., Khalili, K., and Amini, S. (2011). Suppression of HIV-1 transcriptional elongation by a DING phosphatase. *J. Cell. Biochem.* 112, 225–232.
- Darbinian-Sarkissian, N., Darbinyan, A., Otte, J., Radhakrishnan, S., Sawaya, B.E., Arzumanyan, A., Chipitsyna, G., Popov, Y., Rappaport, J., Amini, S., et al. (2006). p27(SJ), a novel protein in St John's Wort, that suppresses expression of HIV-1 genome. *Gene Ther.* 13, 288–295.
- Darcis, G., Kula, A., Bouchat, S., Fujinaga, K., Corazza, F., Ait-Ammar, A., Delacourt, N., Melard, A., Kabeya, K., Vanhulle, C., et al. (2015). An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various In Vitro and Ex Vivo HIV-1 Latency Models Identified Bryostatins-1+JQ1 and Ingenol-B+JQ1 to Potently Reactivate Viral Gene Expression. *PLoS Pathog.* 11, e1005063.
- Darcis, G., Bouchat, S., Kula, A., Van Driessche, B., Delacourt, N., Vanhulle, C., Avettand-Fenoel, V., De Wit, S., Rohr, O., Rouzioux, C., et al. (2017). Reactivation capacity by latency-reversing agents ex vivo correlates with the size of the HIV-1 reservoir. *AIDS* 31, 181–189.
- Davey, R.T., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T.-W., Metcalf, J.A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R.A., Adelsberger, J.W., Miller, K.D., et al. (1999). HIV-1 and T cell dynamics after

- interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *PNAS* *96*, 15109–15114.
- Davis-Gardner, M.E., Gardner, M.R., Alfant, B., and Farzan, M. (2017). eCD4-Ig promotes ADCC activity of sera from HIV-1-infected patients. *PLoS Pathog.* *13*, e1006786.
- Day, J.R., Münk, C., and Guatelli, J.C. (2004). The membrane-proximal tyrosine-based sorting signal of human immunodeficiency virus type 1 gp41 is required for optimal viral infectivity. *J. Virol.* *78*, 1069–1079.
- Deeks, S.G. (2012). HIV: Shock and kill. *Nature* *487*, 439–440.
- Deeks, S.G., Lewin, S.R., Ross, A.L., Ananworanich, J., Benkirane, M., Cannon, P., Chomont, N., Douek, D., Lifson, J.D., Lo, Y.-R., et al. (2016a). International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nat. Med.* *22*, 839–850.
- Deeks, S.G., Lewin, S.R., Ross, A.L., Ananworanich, J., Benkirane, M., Cannon, P., Chomont, N., Douek, D., Lifson, J.D., Lo, Y.-R., et al. (2016b). International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nat. Med.* *22*, 839–850.
- Delwart, E., Magierowska, M., Royz, M., Foley, B., Peddada, L., Smith, R., Heldebrant, C., Conrad, A., and Busch, M. (2002). Homogeneous quasispecies in 16 out of 17 individuals during very early HIV-1 primary infection. *AIDS* *16*, 189–195.
- Descours, B., Petitjean, G., López-Zaragoza, J.-L., Bruel, T., Raffel, R., Psomas, C., Reynes, J., Lacabaratz, C., Levy, Y., Schwartz, O., et al. (2017). CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature* *543*, 564–567.
- Diamond, T.L., Roshal, M., Jamburuthugoda, V.K., Reynolds, H.M., Merriam, A.R., Lee, K.Y., Balakrishnan, M., Bambara, R.A., Planelles, V., Dewhurst, S., et al. (2004). Macrophage tropism of HIV-1 depends on efficient cellular dNTP utilization by reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* *279*, 51545–51553.
- Ding, Y., Liu, J., Lu, S., Igweze, J., Xu, W., Kuang, D., Zealey, C., Liu, D., Gregor, A., Bozorgzad, A., et al. (2016). Self-assembling peptide for co-delivery of HIV-1 CD8+ T cells epitope and Toll-like receptor 7/8 agonists R848 to induce maturation of monocyte derived dendritic cell and augment polyfunctional cytotoxic T lymphocyte (CTL) response. *J Control Release* *236*, 22–30.
- Dion, M.-L., Bordi, R., Zeidan, J., Asaad, R., Boulassel, M.-R., Routy, J.-P., Lederman, M.M., Sekaly, R.-P., and Cheynier, R. (2007). Slow disease progression and robust therapy-mediated CD4+ T-cell recovery are associated with efficient thymopoiesis during HIV-1 infection. *Blood* *109*, 2912–2920.
- Djeghader, A., Gotthard, G., Suh, A., Gonzalez, D., Scott, K., Elias, M., and Chabriere, E. (2013). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a DING protein from *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* *69*, 425–429.
- Doms, R.W., Earl, P.L., and Moss, B. (1991). The assembly of the HIV-1 env glycoprotein into dimers and tetramers. *Adv. Exp. Med. Biol.* *300*, 203-219; discussion 220-221.
- Dong, C., Janas, A.M., Wang, J.-H., Olson, W.J., and Wu, L. (2007). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection. *J. Virol.* *81*, 11352–11362.
- Douek, D.C., Picker, L.J., and Koup, R.A. (2003). T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 265–304.
- Dubay, J.W., Roberts, S.J., Brody, B., and Hunter, E. (1992a). Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity. *J. Virol.* *66*, 4748–4756.

- Dubay, J.W., Roberts, S.J., Hahn, B.H., and Hunter, E. (1992b). Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *J. Virol.* *66*, 6616–6625.
- Earl, P.L., Doms, R.W., and Moss, B. (1990). Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 648–652.
- Earl, P.L., Koenig, S., and Moss, B. (1991). Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* *65*, 31–41.
- Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., and Koyanagi, Y. (2013). Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci Rep* *3*, 2510.
- Egan, M.A., Carruth, L.M., Rowell, J.F., Yu, X., and Siliciano, R.F. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *J. Virol.* *70*, 6547–6556.
- Eilebrecht, S., Le Douce, V., Riclet, R., Targat, B., Hallay, H., Van Driessche, B., Schwartz, C., Robette, G., Van Lint, C., Rohr, O., et al. (2014). HMGA1 recruits CTIP2-repressed P-TEFb to the HIV-1 and cellular target promoters. *Nucleic Acids Res.* *42*, 4962–4971.
- Ellery, P.J., Tippett, E., Chiu, Y.-L., Paukovics, G., Cameron, P.U., Solomon, A., Lewin, S.R., Gorry, P.R., Jaworowski, A., Greene, W.C., et al. (2007). The CD16⁺ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J. Immunol.* *178*, 6581–6589.
- Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J.L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K., and Haase, A.T. (1993). Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* *362*, 359–362.
- Emerman, M., Vazeux, R., and Peden, K. (1989). The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell* *57*, 1155–1165.
- Etemad-Moghadam, B., Sun, Y., Nicholson, E.K., Fernandes, M., Liou, K., Gomila, R., Lee, J., and Sodroski, J. (2000). Envelope glycoprotein determinants of increased fusogenicity in a pathogenic simian-human immunodeficiency virus (SHIV-KB9) passaged in vivo. *J. Virol.* *74*, 4433–4440.
- Evans, V.A., Kumar, N., Filali, A., Procopio, F.A., Yegorov, O., Goulet, J.-P., Saleh, S., Haddad, E.K., da Fonseca Pereira, C., Ellenberg, P.C., et al. (2013). Myeloid Dendritic Cells Induce HIV-1 Latency in Non-proliferating CD4⁺ T Cells. *PLoS Pathog* *9*.
- Fabre-Mersseman, V., Dutrieux, J., Louise, A., Rozlan, S., Lamine, A., Parker, R., Rancez, M., Nunes-Cabaço, H., Sousa, A.E., Lambotte, O., et al. (2011). CD4⁺ recent thymic emigrants are infected by HIV in vivo, implication for pathogenesis. *AIDS* *25*, 1153–1162.
- Fais, S., Burgio, V.L., Capobianchi, M.R., Gessani, S., Pallone, F., and Belardelli, F. (1997). The biological relevance of polykaryons in the immune response. *Immunol. Today* *18*, 522–527.
- Felber, B.K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T., and Pavlakis, G.N. (1989). rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *86*, 1495–1499.
- Felzien, L.K., Woffendin, C., Hottiger, M.O., Subbramanian, R.A., Cohen, E.A., and Nabel, G.J. (1998). HIV transcriptional activation by the accessory protein, VPR, is mediated by the p300 co-activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 5281–5286.
- Fermin, C.D., and Garry, R.F. (1992). Membrane alterations linked to early interactions of HIV

- with the cell surface. *Virology* *191*, 941–946.
- Ferri, K.F., Jacotot, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. (2000a). Apoptosis and karyogamy in syncytia induced by the HIV-1-envelope glycoprotein complex. *Cell Death Differ.* *7*, 1137–1139.
- Ferri, K.F., Jacotot, E., Leduc, P., Geuskens, M., Ingber, D.E., and Kroemer, G. (2000b). Apoptosis of syncytia induced by the HIV-1-envelope glycoprotein complex: influence of cell shape and size. *Exp. Cell Res.* *261*, 119–126.
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., et al. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* *278*, 1295–1300.
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J.D., Margolick, J.B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C., et al. (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* *5*, 512–517.
- Fischl, M.A., Richman, D.D., Grieco, M.H., Gottlieb, M.S., Volberding, P.A., Laskin, O.L., Leedom, J.M., Groopman, J.E., Mildvan, D., and Schooley, R.T. (1987). The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.* *317*, 185–191.
- Fouchier, R.A., Groenink, M., Kootstra, N.A., Tersmette, M., Huisman, H.G., Miedema, F., and Schuitemaker, H. (1992). Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J. Virol.* *66*, 3183–3187.
- Fraser, C., Hollingsworth, T.D., Chapman, R., de Wolf, F., and Hanage, W.P. (2007). Variation in HIV-1 set-point viral load: Epidemiological analysis and an evolutionary hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 17441–17446.
- Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2002). Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* *109*, 295–299.
- Freed, E.O., and Martin, M.A. (1995). The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J. Biol. Chem.* *270*, 23883–23886.
- Freed, E.O., Myers, D.J., and Risser, R. (1989). Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J. Virol.* *63*, 4670–4675.
- Freed, E.O., Myers, D.J., and Risser, R. (1990). Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *87*, 4650–4654.
- Freed, E.O., Myers, D.J., and Risser, R. (1991). Identification of the principal neutralizing determinant of human immunodeficiency virus type 1 as a fusion domain. *J. Virol.* *65*, 190–194.
- Friis-Møller, N., Thiébaud, R., Reiss, P., Weber, R., Monforte, A.D., De Wit, S., El-Sadr, W., Fontas, E., Worm, S., Kirk, O., et al. (2010). Predicting the risk of cardiovascular disease in HIV-infected patients: the data collection on adverse effects of anti-HIV drugs study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* *17*, 491–501.
- Fujinaga, K., Zhong, Q., Nakaya, T., Kameoka, M., Meguro, T., Yamada, K., and Ikuta, K. (1995). Extracellular Nef protein regulates productive HIV-1 infection from latency. *J. Immunol.* *155*, 5289–5298.
- Gabuzda, D.H., Lever, A., Terwilliger, E., and Sodroski, J. (1992). Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1

- envelope glycoproteins. *J. Virol.* 66, 3306–3315.
- Ganesh, L., Burstein, E., Guha-Niyogi, A., Louder, M.K., Mascola, J.R., Klomp, L.W.J., Wijmenga, C., Duckett, C.S., and Nabel, G.J. (2003). The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4⁺ lymphocytes. *Nature* 426, 853–857.
- Garber, M.E., Mayall, T.P., Suess, E.M., Meisenhelder, J., Thompson, N.E., and Jones, K.A. (2000). CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6958–6969.
- Garden, G.A., Guo, W., Jayadev, S., Tun, C., Balcaitis, S., Choi, J., Montine, T.J., Möller, T., and Morrison, R.S. (2004). HIV associated neurodegeneration requires p53 in neurons and microglia. *FASEB J.* 18, 1141–1143.
- Garg, H., and Blumenthal, R. (2006). HIV gp41-induced apoptosis is mediated by caspase-3-dependent mitochondrial depolarization, which is inhibited by HIV protease inhibitor nelfinavir. *J. Leukoc. Biol.* 79, 351–362.
- Garg, H., and Blumenthal, R. (2008). Role of HIV Gp41 mediated fusion/hemifusion in bystander apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3134–3144.
- Gatti, P.J., Choi, B., Haislip, A.M., Fermin, C.D., and Garry, R.F. (1998). Inhibition of HIV type 1 production by hygromycin B. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14, 885–892.
- Gawrisch, K., Han, K.H., Yang, J.S., Bergelson, L.D., and Ferretti, J.A. (1993). Interaction of peptide fragment 828-848 of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type I with lipid bilayers. *Biochemistry* 32, 3112–3118.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., et al. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587–597.
- Geleziunas, R., Miller, M.D., and Greene, W.C. (1996). Unraveling the function of HIV type 1 Nef. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12, 1579–1582.
- Genini, D., Sheeter, D., Rought, S., Zaunders, J.J., Susin, S.A., Kroemer, G., Richman, D.D., Carson, D.A., Corbeil, J., and Leoni, L.M. (2001). HIV induces lymphocyte apoptosis by a p53-initiated, mitochondrial-mediated mechanism. *FASEB J.* 15, 5–6.
- Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H., Doudna, J.A., et al. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154, 442–451.
- Gorantla, S., Gendelman, H.E., and Poluektova, L.Y. (2012). Can humanized mice reflect the complex pathobiology of HIV-associated neurocognitive disorders? *J Neuroimmune Pharmacol* 7, 352–362.
- Goudsmit, J., Debouck, C., Meloen, R.H., Smit, L., Bakker, M., Asher, D.M., Wolff, A.V., Gibbs, C.J., and Gajdusek, D.C. (1988). Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 4478–4482.
- Granelli-Piperno, A., Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W., and Steinman, R.M. (1998). Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J. Virol.* 72, 2733–2737.
- Gratton, S., Cheynier, R., Dumaurier, M.J., Oksenhendler, E., and Wain-Hobson, S. (2000). Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 14566–14571.

- Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Sousa, A.E., Victorino, R.M.M., and Paul, W.E. (2002). CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat. Med.* *8*, 319–323.
- Guatelli, J.C., Gingeras, T.R., and Richman, D.D. (1990). Alternative splice acceptor utilization during human immunodeficiency virus type 1 infection of cultured cells. *J. Virol.* *64*, 4093–4098.
- Gulick, R.M., Mellors, J.W., Havlir, D., Eron, J.J., Gonzalez, C., McMahon, D., Richman, D.D., Valentine, F.T., Jonas, L., Meibohm, A., et al. (1997). Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* *337*, 734–739.
- Gutierrez-Ramos, J.C., Olsson, C., and Palacios, R. (1992). Interleukin (IL1 to IL7) gene expression in fetal liver and bone marrow stromal clones: cytokine-mediated positive and negative regulation. *Exp. Hematol.* *20*, 986–990.
- Haffar, O.K., Dowbenko, D.J., and Berman, P.W. (1988). Topogenic analysis of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, gp160, in microsomal membranes. *J. Cell Biol.* *107*, 1677–1687.
- Halper-Stromberg, A., and Nussenzweig, M.C. (2016). Towards HIV-1 remission: potential roles for broadly neutralizing antibodies. *J. Clin. Invest.* *126*, 415–423.
- Halper-Stromberg, A., Lu, C.-L., Klein, F., Horwitz, J.A., Bournazos, S., Nogueira, L., Eisenreich, T.R., Liu, C., Gazumyan, A., Schaefer, U., et al. (2014). Broadly neutralizing antibodies and viral inducers decrease rebound from HIV-1 latent reservoirs in humanized mice. *Cell* *158*, 989–999.
- Hammer, S.M., Katzenstein, D.A., Hughes, M.D., Gundacker, H., Schooley, R.T., Haubrich, R.H., Henry, W.K., Lederman, M.M., Phair, J.P., Niu, M., et al. (1996). A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *N. Engl. J. Med.* *335*, 1081–1090.
- Hammer, S.M., Squires, K.E., Hughes, M.D., Grimes, J.M., Demeter, L.M., Currier, J.S., Eron, J.J.J., Feinberg, J.E., Balfour, H.H.J., Deyton, L.R., et al. (1997). A Controlled Trial of Two Nucleoside Analogues plus Indinavir in Persons with Human Immunodeficiency Virus Infection and CD4 Cell Counts of 200 per Cubic Millimeter or Less. *New England Journal of Medicine* *337*, 725–733.
- Han, Y., Lassen, K., Monie, D., Sedaghat, A.R., Shimoji, S., Liu, X., Pierson, T.C., Margolick, J.B., Siliciano, R.F., and Siliciano, J.D. (2004). Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *J. Virol.* *78*, 6122–6133.
- Hanna, Z., Kay, D.G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S., and Jolicoeur, P. (1998). Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* *95*, 163–175.
- Harezlak, J., Buchthal, S., Taylor, M., Schifitto, G., Zhong, J., Daar, E., Alger, J., Singer, E., Campbell, T., Yiannoutsos, C., et al. (2011). Persistence of HIV-associated cognitive impairment, inflammation, and neuronal injury in era of highly active antiretroviral treatment. *AIDS* *25*, 625–633.
- Harezlak, J., Cohen, R., Gongvatana, A., Taylor, M., Buchthal, S., Schifitto, G., Zhong, J., Daar, E.S., Alger, J.R., Brown, M., et al. (2014). Predictors of CNS injury as measured by proton magnetic resonance spectroscopy in the setting of chronic HIV infection and CART. *J. Neurovirol.* *20*, 294–303.

- Harris, R.S., Bishop, K.N., Sheehy, A.M., Craig, H.M., Petersen-Mahrt, S.K., Watt, I.N., Neuberger, M.S., and Malim, M.H. (2003). DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* *113*, 803–809.
- Hashimoto, F., Oyaizu, N., Kalyanaraman, V.S., and Pahwa, S. (1997). Modulation of Bcl-2 protein by CD4 cross-linking: a possible mechanism for lymphocyte apoptosis in human immunodeficiency virus infection and for rescue of apoptosis by interleukin-2. *Blood* *90*, 745–753.
- Haughey, N.J., and Mattson, M.P. (2002). Calcium dysregulation and neuronal apoptosis by the HIV-1 proteins Tat and gp120. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *31 Suppl 2*, S55-61.
- Haworth, K.G., Peterson, C.W., and Kiem, H.-P. (2017). CCR5-edited gene therapies for HIV cure: Closing the door to viral entry. *Cytotherapy* *19*, 1325–1338.
- Hayward, P. (2004). Viral proteins cause cell death in HIV-associated dementia. *Lancet Neurol* *3*, 325.
- Heaphy, S., Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M., and Skinner, M.A. (1990). HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* *60*, 685–693.
- Hellerstein, M.K., Hoh, R.A., Hanley, M.B., Cesar, D., Lee, D., Neese, R.A., and McCune, J.M. (2003). Subpopulations of long-lived and short-lived T cells in advanced HIV-1 infection. *J. Clin. Invest.* *112*, 956–966.
- Hellmuth, J., Valcour, V., and Spudich, S. (2015). CNS reservoirs for HIV: implications for eradication. *J Virus Erad* *1*, 67–71.
- Helseth, E., Olshevsky, U., Gabuzda, D., Ardman, B., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1990). Changes in the transmembrane region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein affect membrane fusion. *J. Virol.* *64*, 6314–6318.
- Henrich, T., Hatano, H., Hill, A., Bacon, O., Kearney, M., Blankson, J., Cohen, S., Abdel Mohsen, M., Fromentin, R., Spindler, J., et al. (2017a). Prolonged HIV-1 remission and viral rebound in an individual treated during hyperacute infection. *IAS*.
- Henrich, T.J., Hanhauser, E., Marty, F.M., Sirignano, M.N., Keating, S., Lee, T.-H., Robles, Y.P., Davis, B.T., Li, J.Z., Heisey, A., et al. (2014). Antiretroviral-free HIV-1 remission and viral rebound after allogeneic stem cell transplantation: report of 2 cases. *Ann. Intern. Med.* *161*, 319–327.
- Henrich, T.J., Hatano, H., Bacon, O., Hogan, L.E., Rutishauser, R., Hill, A., Kearney, M.F., Anderson, E.M., Buchbinder, S.P., Cohen, S.E., et al. (2017b). HIV-1 persistence following extremely early initiation of antiretroviral therapy (ART) during acute HIV-1 infection: An observational study. *PLoS Med.* *14*, e1002417.
- Heufler, C., Topar, G., Grasseger, A., Stanzl, U., Koch, F., Romani, N., Namen, A.E., and Schuler, G. (1993). Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes. *J. Exp. Med.* *178*, 1109–1114.
- Ho, Y.-C., Shan, L., Hosmane, N.N., Wang, J., Laskey, S.B., Rosenbloom, D.I.S., Lai, J., Blankson, J.N., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2013). Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* *155*, 540–551.
- Hocqueloux, L., Prazuck, T., Avettand-Fenoel, V., Lafeuillade, A., Cardon, B., Viard, J.-P., and Rouzioux, C. (2010). Long-term immunovirologic control following antiretroviral therapy interruption in patients treated at the time of primary HIV-1 infection. *AIDS* *24*, 1598–1601.
- Hodel, F., Patxot, M., Snäkä, T., and Ciuffi, A. (2016). HIV-1 latent reservoir: size matters. *Future Virol* *11*, 785–794.

- Holm, G.H., Zhang, C., Gorry, P.R., Peden, K., Schols, D., De Clercq, E., and Gabuzda, D. (2004). Apoptosis of bystander T cells induced by human immunodeficiency virus type 1 with increased envelope/receptor affinity and coreceptor binding site exposure. *J. Virol.* **78**, 4541–4551.
- Hongjaisee, S., Braibant, M., Barin, F., Ngo-Giang-Huong, N., Sirirungsi, W., and Samleerat, T. (2017). Effect of Amino Acid Substitutions Within the V3 Region of HIV-1 CRF01_AE on Interaction with CCR5-Coreceptor. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **33**, 946–951.
- Huang, C., Tang, M., Zhang, M.-Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R.L., Dimitrov, D.S., Korber, B., Sodroski, J., Wilson, I.A., et al. (2005). Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science* **310**, 1025–1028.
- Huang, J., Wang, F., Argyris, E., Chen, K., Liang, Z., Tian, H., Huang, W., Squires, K., Verlinghieri, G., and Zhang, H. (2007). Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat. Med.* **13**, 1241–1247.
- Hunter, E., and Swanstrom, R. (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **157**, 187–253.
- Hütter, G., and Thiel, E. (2011). Allogeneic transplantation of CCR5-deficient progenitor cells in a patient with HIV infection: an update after 3 years and the search for patient no. 2. *AIDS* **25**, 273–274.
- Hütter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Müssig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kücherer, C., Blau, O., et al. (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* **360**, 692–698.
- Hwang, S.S., Boyle, T.J., Lyerly, H.K., and Cullen, B.R. (1991). Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**, 71–74.
- Ihrke, G., Kytälä, A., Russell, M.R.G., Rous, B.A., and Luzio, J.P. (2004). Differential use of two AP-3-mediated pathways by lysosomal membrane proteins. *Traffic* **5**, 946–962.
- Imaz, A., Martinez-Picado, J., Niubó, J., Kashuba, A.D.M., Ferrer, E., Ouchi, D., Sykes, C., Rozas, N., Acerete, L., Curto, J., et al. (2016). HIV-1-RNA Decay and Dolutegravir Concentrations in Semen of Patients Starting a First Antiretroviral Regimen. *J. Infect. Dis.* **214**, 1512–1519.
- Ishida, T., Hamano, A., Koiwa, T., and Watanabe, T. (2006). 5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals. *Retrovirology* **3**, 69.
- Iwatani, Y., Ueno, T., Nishimura, A., Zhang, X., Hattori, T., Ishimoto, A., Ito, M., and Sakai, H. (2001). Modification of virus infectivity by cytoplasmic tail of HIV-1 TM protein. *Virus Res.* **74**, 75–87.
- Jaworski, J.P., Vendrell, A., and Chiavenna, S.M. (2016). Neutralizing Monoclonal Antibodies to Fight HIV-1: On the Threshold of Success. *Front Immunol* **7**, 661.
- Jenabian, M.-A., Costiniuk, C.T., Mehraj, V., Ghazawi, F.M., Fromentin, R., Brousseau, J., Brassard, P., Bélanger, M., Ancuta, P., Bendayan, R., et al. (2016). Immune tolerance properties of the testicular tissue as a viral sanctuary site in ART-treated HIV-infected adults. *AIDS* **30**, 2777–2786.
- Jiang, G., and Dandekar, S. (2015). Targeting NF- κ B signaling with protein kinase C agonists as an emerging strategy for combating HIV latency. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **31**, 4–12.
- Jiang, G., Espeseth, A., Hazuda, D.J., and Margolis, D.M. (2007). c-Myc and Sp1 contribute to proviral latency by recruiting histone deacetylase 1 to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J. Virol.* **81**, 10914–10923.
- Jiang, G., Mendes, E.A., Kaiser, P., Sankaran-Walters, S., Tang, Y., Weber, M.G., Melcher, G.P., Thompson, G.R., Tanuri, A., Pianowski, L.F., et al. (2014). Reactivation of HIV latency by a

- newly modified Ingenol derivative via protein kinase C δ -NF- κ B signaling. *AIDS* 28, 1555–1566.
- Jin, F., Jansson, J., Law, M., Prestage, G.P., Zablotska, I., Imrie, J.C.G., Kippax, S.C., Kaldor, J.M., Grulich, A.E., and Wilson, D.P. (2010). Per-contact probability of HIV transmission in homosexual men in Sydney in the era of HAART. *AIDS* 24, 907–913.
- Jones, R.B., O'Connor, R., Mueller, S., Foley, M., Szeto, G.L., Karel, D., Lichtenfeld, M., Kovacs, C., Ostrowski, M.A., Trocha, A., et al. (2014). Histone deacetylase inhibitors impair the elimination of HIV-infected cells by cytotoxic T-lymphocytes. *PLoS Pathog.* 10, e1004287.
- Jordan, A., Defechereux, P., and Verdin, E. (2001). The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J.* 20, 1726–1738.
- Jordan, A., Bisgrove, D., and Verdin, E. (2003). HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J.* 22, 1868–1877.
- Jordan-Sciutto, K.L., Wang, G., Murphy-Corb, M., and Wiley, C.A. (2000). Induction of cell-cycle regulators in simian immunodeficiency virus encephalitis. *Am. J. Pathol.* 157, 497–507.
- Josefsson, L., von Stockenström, S., Faria, N.R., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., Epling, L., Tan, A., Ho, T., Lemey, P., et al. (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, E4987-4996.
- Jung, A., Maier, R., Vartanian, J.-P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., Meese, E., Wain-Hobson, S., and Meyerhans, A. (2002). Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* 418, 144.
- Kahn, J.O., and Walker, B.D. (1998). Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 339, 33–39.
- Kalia, V., Sarkar, S., Gupta, P., and Montelaro, R.C. (2003). Rational site-directed mutations of the LLP-1 and LLP-2 lentivirus lytic peptide domains in the intracytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 gp41 indicate common functions in cell-cell fusion but distinct roles in virion envelope incorporation. *J. Virol.* 77, 3634–3646.
- Kamath, S., and Wong, T.C. (2002). Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion domain by molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* 83, 135–143.
- Kapasi, A.A., Patel, G., Franki, N., and Singhal, P.C. (2002). HIV-1 gp120-induced tubular epithelial cell apoptosis is mediated through p38-MAPK phosphorylation. *Mol. Med.* 8, 676–685.
- Kauder, S.E., Bosque, A., Lindqvist, A., Planelles, V., and Verdin, E. (2009). Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathog.* 5, e1000495.
- Kaul, M., and Lipton, S.A. (1999). Chemokines and activated macrophages in HIV gp120-induced neuronal apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8212–8216.
- Kay, J.E. (1991). Mechanisms of T lymphocyte activation. *Immunol. Lett.* 29, 51–54.
- Kearney, M.F., Wiegand, A., Shao, W., Coffin, J.M., Mellors, J.W., Lederman, M., Gandhi, R.T., Keele, B.F., and Li, J.Z. (2015). Origin of Rebound Plasma HIV Includes Cells with Identical Proviruses That Are Transcriptionally Active before Stopping of Antiretroviral Therapy. *J. Virol.* 90, 1369–1376.
- Kempf, D.J., King, M.S., Bernstein, B., Cernohous, P., Bauer, E., Moseley, J., Gu, K., Hsu, A., Brun, S., and Sun, E. (2004). Incidence of resistance in a double-blind study comparing lopinavir/ritonavir plus stavudine and lamivudine to nelfinavir plus stavudine and lamivudine. *J. Infect. Dis.* 189, 51–60.
- Kennedy, R.C., Henkel, R.D., Pauletti, D., Allan, J.S., Lee, T.H., Essex, M., and Dreesman, G.R.

- (1986). Antiserum to a synthetic peptide recognizes the HTLV-III envelope glycoprotein. *Science* 231, 1556–1559.
- Kessing, C.F., Nixon, C.C., Li, C., Tsai, P., Takata, H., Mousseau, G., Ho, P.T., Honeycutt, J.B., Fallahi, M., Trautmann, L., et al. (2017). In Vivo Suppression of HIV Rebound by Didehydro-Cortistatin A, a “Block-and-Lock” Strategy for HIV-1 Treatment. *Cell Rep* 21, 600–611.
- Kiernan, R.E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K.T., et al. (1999). HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J.* 18, 6106–6118.
- Kim, S.Y., Byrn, R., Groopman, J., and Baltimore, D. (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J. Virol.* 63, 3708–3713.
- Kino, T., Gragerov, A., Slobodskaya, O., Tsopanomichalou, M., Chrousos, G.P., and Pavlakis, G.N. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J. Virol.* 76, 9724–9734.
- Kirchhoff, F., Greenough, T.C., Brettler, D.B., Sullivan, J.L., and Desrosiers, R.C. (1995). Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 332, 228–232.
- Kitrinos, K.M., Hoffman, N.G., Nelson, J.A.E., and Swanstrom, R. (2003). Turnover of env variable region 1 and 2 genotypes in subjects with late-stage human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 77, 6811–6822.
- Kobayashi-Ishihara, M., Yamagishi, M., Hara, T., Matsuda, Y., Takahashi, R., Miyake, A., Nakano, K., Yamochi, T., Ishida, T., and Watanabe, T. (2012). HIV-1-encoded antisense RNA suppresses viral replication for a prolonged period. *Retrovirology* 9, 38.
- Kondo, N., Miyauchi, K., Meng, F., Iwamoto, A., and Matsuda, Z. (2010). Conformational changes of the HIV-1 envelope protein during membrane fusion are inhibited by the replacement of its membrane-spanning domain. *J. Biol. Chem.* 285, 14681–14688.
- Kondrack, R.M., Harbertson, J., Tan, J.T., McBreen, M.E., Surh, C.D., and Bradley, L.M. (2003). Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J. Exp. Med.* 198, 1797–1806.
- Konermann, S., Brigham, M.D., Trevino, A.E., Joung, J., Abudayyeh, O.O., Barcena, C., Hsu, P.D., Habib, N., Gootenberg, J.S., Nishimasu, H., et al. (2015). Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 517, 583–588.
- Kort, J.J. (1998). Impairment of excitatory amino acid transport in astroglial cells infected with the human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14, 1329–1339.
- Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, D.D. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* 68, 4650–4655.
- Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Goh, W.C., Terwilliger, E., Dayton, A., Rosen, C., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1987). Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 237, 1351–1355.
- Kowalski, M., Bergeron, L., Dorfman, T., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1991). Attenuation of human immunodeficiency virus type 1 cytopathic effect by a mutation affecting the transmembrane envelope glycoprotein. *J. Virol.* 65, 281–291.
- Kumar, N.A., Cheong, K., Powell, D.R., da Fonseca Pereira, C., Anderson, J., Evans, V.A., Lewin, S.R., and Cameron, P.U. (2015). The role of antigen presenting cells in the induction of

- HIV-1 latency in resting CD4+ T-cells. *Retrovirology* 12.
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., and Hendrickson, W.A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648–659.
- Kyttälä, A., Yliannala, K., Schu, P., Jalanko, A., and Luzio, J.P. (2005). AP-1 and AP-3 facilitate lysosomal targeting of Batten disease protein CLN3 via its dileucine motif. *J. Biol. Chem.* 280, 10277–10283.
- LaBonte, J.A., Patel, T., Hofmann, W., and Sodroski, J. (2000). Importance of membrane fusion mediated by human immunodeficiency virus envelope glycoproteins for lysis of primary CD4-positive T cells. *J. Virol.* 74, 10690–10698.
- LaBranche, C.C., Sauter, M.M., Haggarty, B.S., Vance, P.J., Romano, J., Hart, T.K., Bugelski, P.J., Marsh, M., and Hoxie, J.A. (1995). A single amino acid change in the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane molecule increases envelope glycoprotein expression on infected cells. *J. Virol.* 69, 5217–5227.
- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654–657.
- Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 by reducing the intracellular pool of deoxynucleotide triphosphates. *Nat Immunol* 13, 223–228.
- Laird, G.M., Eisele, E.E., Rabi, S.A., Lai, J., Chioma, S., Blankson, J.N., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2013). Rapid quantification of the latent reservoir for HIV-1 using a viral outgrowth assay. *PLoS Pathog.* 9, e1003398.
- Landry, S., Halin, M., Lefort, S., Audet, B., Vaquero, C., Mesnard, J.-M., and Barbeau, B. (2007). Detection, characterization and regulation of antisense transcripts in HIV-1. *Retrovirology* 4, 71.
- Lasky, L.A., Nakamura, G., Smith, D.H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T., and Capon, D.J. (1987). Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* 50, 975–985.
- Lay, C.-S., Ludlow, L.E., Stapleton, D., Bellamy-McIntyre, A.K., Ramsland, P.A., Drummer, H.E., and Pombourios, P. (2011). Role for the terminal clasp of HIV-1 gp41 glycoprotein in the initiation of membrane fusion. *J. Biol. Chem.* 286, 41331–41343.
- Le Douce, V., Colin, L., Redel, L., Cherrier, T., Herbein, G., Aunis, D., Rohr, O., Van Lint, C., and Schwartz, C. (2012). LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing. *Nucleic Acids Res.* 40, 1904–1915.
- Lebigot, S., Roingeard, P., Thibault, G., Lemiale, F., Verrier, B., Barin, F., and Brand, D. (2001). The transmembrane protein of HIV-1 primary isolates modulates cell surface expression of their envelope glycoproteins. *Virology* 290, 136–142.
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F., and Hance, A.J. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* 300, 1112.
- Lee, J.-H., Choy, M.L., Ngo, L., Foster, S.S., and Marks, P.A. (2010). Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14639–14644.
- Lee, S.A., Bacchetti, P., Chomont, N., Fromentin, R., Lewin, S.R., O’Doherty, U., Palmer, S., Richman, D.D., Siliciano, J.D., Yukl, S.A., et al. (2016). Anti-HIV Antibody Responses and the HIV Reservoir Size during Antiretroviral Therapy. *PLoS ONE* 11, e0160192.

- Lee, S.F., Wang, C.T., Liang, J.Y., Hong, S.L., Huang, C.C., and Chen, S.S. (2000). Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41. *J. Biol. Chem.* 275, 15809–15819.
- Lee, S.-F., Ko, C.-Y., Wang, C.-T., and Chen, S.S.-L. (2002). Effect of point mutations in the N terminus of the lentivirus lytic peptide-1 sequence of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41 on Env stability. *J. Biol. Chem.* 277, 15363–15375.
- Lee, W.S., Parsons, M.S., Kent, S.J., and Lichtfuss, M. (2015). Can HIV-1-Specific ADCC Assist the Clearance of Reactivated Latently Infected Cells? *Front Immunol* 6, 265.
- Lehrman, G., Hogue, I.B., Palmer, S., Jennings, C., Spina, C.A., Wiegand, A., Landay, A.L., Coombs, R.W., Richman, D.D., Mellors, J.W., et al. (2005). Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet* 366, 549–555.
- Lelièvre, J.D., Mammano, F., Arnoult, D., Petit, F., Grodet, A., Estaquier, J., and Ameisen, J.C. (2004). A novel mechanism for HIV1-mediated bystander CD4+ T-cell death: neighboring dying cells drive the capacity of HIV1 to kill noncycling primary CD4+ T cells. *Cell Death Differ.* 11, 1017–1027.
- Leonard, C.K., Spellman, M.W., Riddle, L., Harris, R.J., Thomas, J.N., and Gregory, T.J. (1990). Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 265, 10373–10382.
- Lesner, A., Shilpi, R., Ivanova, A., Gawinowicz, M.A., Lesniak, J., Nikolov, D., and Simm, M. (2009). Identification of X-DING-CD4, a new member of human DING protein family that is secreted by HIV-1 resistant CD4(+) T cells and has anti-viral activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 389, 284–289.
- Levine, B.L., Mosca, J.D., Riley, J.L., Carroll, R.G., Vahey, M.T., Jagodzinski, L.L., Wagner, K.F., Mayers, D.L., Burke, D.S., Weislow, O.S., et al. (1996). Antiviral effect and ex vivo CD4+ T cell proliferation in HIV-positive patients as a result of CD28 costimulation. *Science* 272, 1939–1943.
- Levy, D.N., Refaeli, Y., and Weiner, D.B. (1995). Extracellular Vpr protein increases cellular permissiveness to human immunodeficiency virus replication and reactivates virus from latency. *J. Virol.* 69, 1243–1252.
- Li, J., Huston, G., and Swain, S.L. (2003). IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J. Exp. Med.* 198, 1807–1815.
- Li, W.Q., Jiang, Q., Khaled, A.R., Keller, J.R., and Durum, S.K. (2004). Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival. *J. Biol. Chem.* 279, 29160–29166.
- Li, X., Zhang, J., Xie, Y., Jiang, Y., Yingjie, Z., and Xu, W. (2014). Progress of HDAC inhibitor panobinostat in the treatment of cancer. *Curr Drug Targets* 15, 622–634.
- Li, Z., Guo, J., Wu, Y., and Zhou, Q. (2013). The BET bromodomain inhibitor JQ1 activates HIV latency through antagonizing Brd4 inhibition of Tat-transactivation. *Nucleic Acids Res.* 41, 277–287.
- Liao, H.-K., Gu, Y., Diaz, A., Marlett, J., Takahashi, Y., Li, M., Suzuki, K., Xu, R., Hishida, T., Chang, C.-J., et al. (2015). Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat Commun* 6, 6413.
- Lifson, J.D., Feinberg, M.B., Reyes, G.R., Rabin, L., Banapour, B., Chakrabarti, S., Moss, B., Wong-Staal, F., Steimer, K.S., and Engleman, E.G. (1986). Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* 323, 725–728.
- Lin, P.-H., Ke, Y.-Y., Su, C.-T., Shiao, H.-Y., Hsieh, H.-P., Chao, Y.-K., Lee, C.-N., Kao, C.-L., Chao, Y.-S., and Chang, S.-Y. (2011). Inhibition of HIV-1 Tat-mediated transcription by a

- coumarin derivative, BPRHIV001, through the Akt pathway. *J. Virol.* **85**, 9114–9126.
- Liou, L.-Y., Herrmann, C.H., and Rice, A.P. (2002). Transient induction of cyclin T1 during human macrophage differentiation regulates human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivation function. *J. Virol.* **76**, 10579–10587.
- Llano, A., Barretina, J., Gutiérrez, A., Blanco, J., Cabrera, C., Clotet, B., and Esté, J.A. (2001). Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals. *J. Virol.* **75**, 10319–10325.
- Lopez-Vergès, S., Camus, G., Blot, G., Beauvoir, R., Benarous, R., and Berlioz-Torrent, C. (2006). Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 14947–14952.
- Lorenzi, J.C.C., Cohen, Y.Z., Cohn, L.B., Kreider, E.F., Barton, J.P., Learn, G.H., Oliveira, T., Lavine, C.L., Horwitz, J.A., Settler, A., et al. (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**, E7908–E7916.
- Lu, M., Blacklow, S.C., and Kim, P.S. (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 1075–1082.
- Ludwig, L.B., Ambrus, J.L., Krawczyk, K.A., Sharma, S., Brooks, S., Hsiao, C.-B., and Schwartz, S.A. (2006). Human Immunodeficiency Virus-Type 1 LTR DNA contains an intrinsic gene producing antisense RNA and protein products. *Retrovirology* **3**, 80.
- Lyumkis, D., Julien, J.-P., de Val, N., Cupo, A., Potter, C.S., Klasse, P.-J., Burton, D.R., Sanders, R.W., Moore, J.P., Carragher, B., et al. (2013). Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* **342**, 1484–1490.
- Ma, A., Koka, R., and Burkett, P. (2006). Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 657–679.
- Madrigal-Estebas, L., McManus, R., Byrne, B., Lynch, S., Doherty, D.G., Kelleher, D., O'Donoghue, D.P., Feighery, C., and O'Farrelly, C. (1997). Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express two different interleukin-7 mRNA Transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation. *Hum. Immunol.* **58**, 83–90.
- Makutonina, A., Voss, T.G., Plymale, D.R., Fermin, C.D., Norris, C.H., Vigh, S., and Garry, R.F. (1996). Human immunodeficiency virus infection of T-lymphoblastoid cells reduces intracellular pH. *J. Virol.* **70**, 7049–7055.
- Maldarelli, F. (2015). HIV-infected cells are frequently clonally expanded after prolonged antiretroviral therapy: implications for HIV persistence. *J. Virus Erad* **1**, 237–244.
- Maldarelli, F., Wu, X., Su, L., Simonetti, F.R., Shao, W., Hill, S., Spindler, J., Ferris, A.L., Mellors, J.W., Kearney, M.F., et al. (2014). HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* **345**, 179–183.
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P.B., Esvelt, K.M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L., and Church, G.M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* **31**, 833–838.
- Malim, M.H., and Cullen, B.R. (1991). HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* **65**, 241–248.
- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R. (1989). The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**, 254–257.
- Mandal, P.K., Ferreira, L.M.R., Collins, R., Meissner, T.B., Boutwell, C.L., Friesen, M., Vrbanac, V., Garrison, B.S., Stortchevoi, A., Bryder, D., et al. (2014). Efficient ablation of genes in

- human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* 15, 643–652.
- Manganaro, L., Pache, L., Herrmann, T., Marlett, J., Hwang, Y., Murry, J., Miorin, L., Ting, A.T., König, R., García-Sastre, A., et al. (2014). Tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) controls HIV transcription in an NF- κ B-dependent manner. *J. Virol.* 88, 7528–7540.
- Mangus, L.M., Beck, S.E., Queen, S.E., Brill, S.A., Shirk, E.N., Metcalf Pate, K.A., Muth, D.C., Adams, R.J., Gama, L., Clements, J.E., et al. (2018). Lymphocyte-Dominant Encephalitis and Meningitis in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques Receiving Antiretroviral Therapy. *Am. J. Pathol.* 188, 125–134.
- Marban, C., Suzanne, S., Dequiedt, F., de Walque, S., Redel, L., Van Lint, C., Aunis, D., and Rohr, O. (2007). Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J.* 26, 412–423.
- Marban, C., Forouzanfar, F., Ait-Ammar, A., Fahmi, F., El Mekdad, H., Daouad, F., Rohr, O., and Schwartz, C. (2016). Targeting the Brain Reservoirs: Toward an HIV Cure. *Front Immunol* 7, 397.
- Marcello, A., Lusic, M., Pegoraro, G., Pellegrini, V., Beltram, F., and Giacca, M. (2004). Nuclear organization and the control of HIV-1 transcription. *Gene* 326, 1–11.
- Margolis, D.M., Koup, R.A., and Ferrari, G. (2017). HIV antibodies for treatment of HIV infection. *Immunol. Rev.* 275, 313–323.
- Marion, D., Zasloff, M., and Bax, A. (1988). A two-dimensional NMR study of the antimicrobial peptide magainin 2. *FEBS Lett.* 227, 21–26.
- Marsh, J.W. (1999). The numerous effector functions of Nef. *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 192–198.
- Martin, G.E., Pace, M., Thornhill, J.P., Phetsouphanh, C., Hopkins, E., Meyerowitz, J., Nwokolo, N., Fox, J., Willberg, C., Klenerman, P., et al. (2017). Enrichment of the HIV reservoir in CD32+ CD4 T cells occurs early and is closely associated with immune checkpoint receptor expression. *IAS*.
- Masciotra, S., Owen, S.M., Rudolph, D., Yang, C., Wang, B., Saksena, N., Spira, T., Dhawan, S., and Lal, R.B. (2002). Temporal relationship between V1V2 variation, macrophage replication, and coreceptor adaptation during HIV-1 disease progression. *AIDS* 16, 1887–1898.
- Mastroianni, C.M., Forcina, G., d’Ettore, G., Lichtner, M., Mengoni, F., D’Agostino, C., and Vullo, V. (2001). Circulating levels of interleukin-7 in antiretroviral-naïve and highly active antiretroviral therapy-treated HIV-infected patients. *HIV Clin Trials* 2, 108–112.
- Matsushita, S., Robert-Guroff, M., Rusche, J., Koito, A., Hattori, T., Hoshino, H., Javaherian, K., Takatsuki, K., and Putney, S. (1988). Characterization of a human immunodeficiency virus neutralizing monoclonal antibody and mapping of the neutralizing epitope. *J. Virol.* 62, 2107–2114.
- Mbita, Z., Hull, R., and Dlamini, Z. (2014). Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-mediated apoptosis: new therapeutic targets. *Viruses* 6, 3181–3227.
- McCoy, L.E., and Burton, D.R. (2017). Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunol. Rev.* 275, 11–20.
- McCune, J.M. (2001). The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 410, 974–979.
- McCune, J.M., Rabin, L.B., Feinberg, M.B., Lieberman, M., Kosek, J.C., Reyes, G.R., and Weissman, I.L. (1988). Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53, 55–67.

- Melikyan, G.B., Markosyan, R.M., Hemmati, H., Delmedico, M.K., Lambert, D.M., and Cohen, F.S. (2000). Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J. Cell Biol.* *151*, 413–423.
- Mellors, J.W., Rinaldo, C.R., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A., and Kingsley, L.A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* *272*, 1167–1170.
- Méndez, C., Ahlenstiel, C.L., and Kelleher, A.D. (2015). Post-transcriptional gene silencing, transcriptional gene silencing and human immunodeficiency virus. *World J Virol* *4*, 219–244.
- Meyers, J.H., Justement, J.S., Hallahan, C.W., Blair, E.T., Sun, Y.A., O’Shea, M.A., Roby, G., Kottlil, S., Moir, S., Kovacs, C.M., et al. (2007). Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE* *2*, e458.
- Micci, L., Harper, J., Paganini, S., King, C., Ryan, E., Villinger, F., Lifson, J., and Paiardini, M. (2017). Combined IL-21 and IFN α treatment limits residual inflammation and delays viral rebound in SIV-infected macaques. *IAS*.
- Miedema, F., Meyaard, L., Koot, M., Klein, M.R., Roos, M.T., Groenink, M., Fouchier, R.A., Van’t Wout, A.B., Tersmette, M., and Schellekens, P.T. (1994). Changing virus-host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* *140*, 35–72.
- Miller, M.A., Cloyd, M.W., Liebmann, J., Rinaldo, C.R., Islam, K.R., Wang, S.Z., Mietzner, T.A., and Montelaro, R.C. (1993a). Alterations in cell membrane permeability by the lentivirus lytic peptide (LLP-1) of HIV-1 transmembrane protein. *Virology* *196*, 89–100.
- Miller, M.A., Mietzner, T.A., Cloyd, M.W., Robey, W.G., and Montelaro, R.C. (1993b). Identification of a calmodulin-binding and inhibitory peptide domain in the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *9*, 1057–1066.
- Miyake, A., Ishida, T., Yamagishi, M., Hara, T., Umezawa, K., Watanabe, T., and Horie, R. (2010). Inhibition of active HIV-1 replication by NF-kappaB inhibitor DHMEQ. *Microbes Infect.* *12*, 400–408.
- Miyake, K., Tanaka, T., and McNeil, P.L. (2007). Lectin-based food poisoning: a new mechanism of protein toxicity. *PLoS ONE* *2*, e687.
- Miyauchi, K., Komano, J., Yokomaku, Y., Sugiura, W., Yamamoto, N., and Matsuda, Z. (2005). Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *J. Virol.* *79*, 4720–4729.
- Molina, J.M., Gallant, J., Orkin, C., Negredo, E., Bhatti, L., Gathe, J., Van Landuyt, E., Lathouwers, E., Hufkens, V., Vanveggel, S., et al. (2017). Efficacy and safety of switching from boosted-protease inhibitor plus emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate regimens to the single-tablet regimen of darunavir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir alafenamide (D/C/F/TAF) in virologically-suppressed, HIV-1-infected adults through 24 weeks: EMERALD study. *IAS*.
- Monroe, K.M., Yang, Z., Johnson, J.R., Geng, X., Doitsh, G., Krogan, N.J., and Greene, W.C. (2014). IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science* *343*, 428–432.
- Moradigaravand, D., Kouyos, R., Hinkley, T., Haddad, M., Petropoulos, C.J., Engelstädter, J., and Bonhoeffer, S. (2014). Recombination accelerates adaptation on a large-scale empirical fitness landscape in HIV-1. *PLoS Genet.* *10*, e1004439.
- Morieri, M.L., Guardigni, V., Sanz, J.M., Dalla Nora, E., Soavi, C., Zuliani, G., Sighinolfi, L., and Passaro, A. (2018). Adipokines levels in HIV infected patients: lipocalin-2 and fatty acid binding protein-4 as possible markers of HIV and antiretroviral therapy-related adipose

- tissue inflammation. *BMC Infect. Dis.* **18**, 10.
- Mostowy, R., Kouyos, R.D., Fouchet, D., and Bonhoeffer, S. (2011). The role of recombination for the coevolutionary dynamics of HIV and the immune response. *PLoS ONE* **6**, e16052.
- Mota, T.M., Rasmussen, T.A., Rhodes, A., Tennakoon, S., Dantanarayana, A., Wightman, F., Hagenauer, M., Roney, J., Spelman, T., Purcell, D.F.J., et al. (2017). No adverse safety or virological changes 2 years following vorinostat in HIV-infected individuals on antiretroviral therapy. *AIDS* **31**, 1137–1141.
- Mouquet, H. (2014). Antibody B cell responses in HIV-1 infection. *Trends Immunol.* **35**, 549–561.
- Mousseau, G., Clementz, M.A., Bakeman, W.N., Nagarsheth, N., Cameron, M., Shi, J., Baran, P., Fromentin, R., Chomont, N., and Valente, S.T. (2012). An analog of the natural steroidal alkaloid cortistatin A potently suppresses Tat-dependent HIV transcription. *Cell Host Microbe* **12**, 97–108.
- Mousseau, G., Mediouni, S., and Valente, S.T. (2015a). Targeting HIV transcription: the quest for a functional cure. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **389**, 121–145.
- Mousseau, G., Kessing, C.F., Fromentin, R., Trautmann, L., Chomont, N., and Valente, S.T. (2015b). The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *MBio* **6**, e00465.
- Mujib, S., Liu, J., Rahman, A.K.M.N.-U., Schwartz, J.A., Bonner, P., Yue, F.Y., and Ostrowski, M.A. (2017a). Comprehensive cross-clade characterization of antibody-mediated recognition, complement-mediated lysis and cell-mediated cytotoxicity of HIV-1 envelope specific antibodies towards the eradication of the HIV-1 reservoir. *J. Virol.*
- Mujib, S., Saiyed, A., Fadel, S., Bozorgzad, A., Aidarus, N., Yue, F.Y., Benko, E., Kovacs, C., Emert-Sedlak, L.A., Smithgall, T.E., et al. (2017b). Pharmacologic HIV-1 Nef blockade promotes CD8 T cell-mediated elimination of latently HIV-1-infected cells in vitro. *JCI Insight* **2**.
- Munir, S., Thierry, S., Subra, F., Deprez, E., and Delelis, O. (2013). Quantitative analysis of the time-course of viral DNA forms during the HIV-1 life cycle. *Retrovirology* **10**, 87.
- Muñoz-Barroso, I., Salzwedel, K., Hunter, E., and Blumenthal, R. (1999). Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J. Virol.* **73**, 6089–6092.
- Murakami, T. (2008). Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle. *Microbiol. Immunol.* **52**, 287–295.
- Murakami, T., and Freed, E.O. (2000). The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 343–348.
- Murzyn, K., and Pasenkiewicz-Gierula, M. (2003). Construction of a toroidal model for the magainin pore. *J Mol Model* **9**, 217–224.
- Muthumani, K., Wadsworth, S.A., Dayes, N.S., Hwang, D.S., Choo, A.Y., Abeyasinghe, H.R., Siekierka, J.J., and Weiner, D.B. (2004). Suppression of HIV-1 viral replication and cellular pathogenesis by a novel p38/JNK kinase inhibitor. *AIDS* **18**, 739–748.
- Nakatsu, F., and Ohno, H. (2003). Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct. Funct.* **28**, 419–429.
- Napolitano, L.A., Grant, R.M., Deeks, S.G., Schmidt, D., De Rosa, S.C., Herzenberg, L.A., Herndier, B.G., Andersson, J., and McCune, J.M. (2001). Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat. Med.* **7**, 73–79.

- Nardacci, R., Antinori, A., Kroemer, G., and Piacentini, M. (2005). Cell death mechanisms in HIV-associated dementia: the involvement of syncytia. *Cell Death Differ.* *12 Suppl 1*, 855–858.
- Ndolo, T., Dhillon, N.K., Nguyen, H., Guadalupe, M., Mudryj, M., and Dandekar, S. (2002). Simian immunodeficiency virus Nef protein delays the progression of CD4+ T cells through G1/S phase of the cell cycle. *J. Virol.* *76*, 3587–3595.
- Ngo-Giang-Huong, N., Deveau, C., Da Silva, I., Pellegrin, I., Venet, A., Harzic, M., Sinet, M., Delfraissy, J.F., Meyer, L., Goujard, C., et al. (2001). Proviral HIV-1 DNA in subjects followed since primary HIV-1 infection who suppress plasma viral load after one year of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* *15*, 665–673.
- Nicholson, J.K., Cross, G.D., Callaway, C.S., and McDougal, J.S. (1986). In vitro infection of human monocytes with human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV). *J. Immunol.* *137*, 323–329.
- Nottet, H.S.L.M., van Dijk, S.J., Fanoy, E.B., Goedegebuure, I.W., de Jong, D., Vrisekoop, N., van Baarle, D., Boltz, V., Palmer, S., Borleffs, J.C.C., et al. (2009). HIV-1 can persist in aged memory CD4+ T lymphocytes with minimal signs of evolution after 8.3 years of effective highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *50*, 345–353.
- O’Brien, W.A. (1994). HIV-1 entry and reverse transcription in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *56*, 273–277.
- O’Brien, W.A., Koyanagi, Y., Namazie, A., Zhao, J.Q., Diagne, A., Idler, K., Zack, J.A., and Chen, I.S. (1990). HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* *348*, 69–73.
- Ohno, H., Aguilar, R.C., Fournier, M.C., Hennecke, S., Cosson, P., and Bonifacino, J.S. (1997). Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family. *Virology* *238*, 305–315.
- Olshevsky, U., Helseth, E., Furman, C., Li, J., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1990). Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J. Virol.* *64*, 5701–5707.
- Onafuwa-Nuga, A., and Telesnitsky, A. (2009). The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *73*, 451–480, Table of Contents.
- Oosterwegel, M.A., Haks, M.C., Jeffry, U., Murray, R., and Kruisbeek, A.M. (1997). Induction of TCR gene rearrangements in uncommitted stem cells by a subset of IL-7 producing, MHC class-II-expressing thymic stromal cells. *Immunity* *6*, 351–360.
- Orenstein, J.M., Fox, C., and Wahl, S.M. (1997). Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science* *276*, 1857–1861.
- Osorio, A.A., Muñoz, A., Torres-Romero, D., Bedoya, L.M., Perestelo, N.R., Jiménez, I.A., Alcamí, J., and Bazzocchi, I.L. (2012). Olean-18-ene triterpenoids from Celastraceae species inhibit HIV replication targeting NF- κ B and Sp1 dependent transcription. *Eur J Med Chem* *52*, 295–303.
- Osuna, C.E., Apps, R., Lim, S.Y., Kublin, J.S., Thomas, R., Chen, E., G., Y., Han Huang, S., Chan, D., Truong, R., et al. (2017). CD32 does not mark the HIV-1/SIV latent reservoir. HIV Persistence during Therapy.
- Oxenius, A., Price, D.A., Easterbrook, P.J., O’Callaghan, C.A., Kelleher, A.D., Whelan, J.A., Sontag, G., Sewell, A.K., and Phillips, R.E. (2000). Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 3382–3387.

- Pagans, S., Pedal, A., North, B.J., Kaehlcke, K., Marshall, B.L., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Henklein, P., Frye, R., McBurney, M.W., et al. (2005). SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol.* 3, e41.
- Palker, T.J., Clark, M.E., Langlois, A.J., Matthews, T.J., Weinhold, K.J., Randall, R.R., Bolognesi, D.P., and Haynes, B.F. (1988). Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 1932–1936.
- Pallikkuth, S., and Mohan, M. (2015). Adipose Tissue: Sanctuary for HIV/SIV Persistence and Replication. *Trends Microbiol.* 23, 748–750.
- Palmer, C., Balfe, P., Fox, D., May, J.C., Frederiksson, R., Fenyö, E.M., and McKeating, J.A. (1996). Functional characterization of the V1V2 region of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 220, 436–449.
- Pancera, M., Majeed, S., Ban, Y.-E.A., Chen, L., Huang, C., Kong, L., Kwon, Y.D., Stuckey, J., Zhou, T., Robinson, J.E., et al. (2010). Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 1166–1171.
- Pandeló José, D., Bartholomeeusen, K., da Cunha, R.D., Abreu, C.M., Glinski, J., da Costa, T.B.F., Bacchi Rabay, A.F.M., Pianowski Filho, L.F., Dudycz, L.W., Ranga, U., et al. (2014). Reactivation of latent HIV-1 by new semi-synthetic ingenol esters. *Virology* 462–463, 328–339.
- Patel, S., Jones, R.B., Nixon, D.F., and Bollard, C.M. (2016). T-cell therapies for HIV: Preclinical successes and current clinical strategies. *Cytotherapy* 18, 931–942.
- Patera, A.C., Drewry, A.M., Chang, K., Beiter, E.R., Osborne, D., and Hotchkiss, R.S. (2016). Frontline Science: Defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *J. Leukoc. Biol.* 100, 1239–1254.
- Pearson, R., Kim, Y.K., Hokello, J., Lassen, K., Friedman, J., Tyagi, M., and Karn, J. (2008). Epigenetic silencing of human immunodeficiency virus (HIV) transcription by formation of restrictive chromatin structures at the viral long terminal repeat drives the progressive entry of HIV into latency. *J. Virol.* 82, 12291–12303.
- Perelson, A.S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., Markowitz, M., and Ho, D.D. (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 387, 188–191.
- Perfettini, J.-L., Roumier, T., Castedo, M., Larochette, N., Boya, P., Raynal, B., Lazar, V., Ciccocanti, F., Nardacci, R., Penninger, J., et al. (2004). NF-kappaB and p53 are the dominant apoptosis-inducing transcription factors elicited by the HIV-1 envelope. *J. Exp. Med.* 199, 629–640.
- Perfettini, J.-L., Castedo, M., Roumier, T., Andreau, K., Nardacci, R., Piacentini, M., and Kroemer, G. (2005). Mechanisms of apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *Cell Death Differ.* 12 Suppl 1, 916–923.
- Perno, C.F., Newcomb, F.M., Davis, D.A., Aquaro, S., Humphrey, R.W., Calìò, R., and Yarchoan, R. (1998). Relative potency of protease inhibitors in monocytes/macrophages acutely and chronically infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 178, 413–422.
- Perreau, M., Savoye, A.-L., De Crignis, E., Corpataux, J.-M., Cubas, R., Haddad, E.K., De Leval, L., Graziosi, C., and Pantaleo, G. (2013). Follicular helper T cells serve as the major CD4 T cell compartment for HIV-1 infection, replication, and production. *J. Exp. Med.* 210, 143–156.

- Persaud, D., Gay, H., Ziemniak, C., Chen, Y.H., Piatak, M., Chun, T.-W., Strain, M., Richman, D., and Luzuriaga, K. (2013). Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. *N. Engl. J. Med.* 369, 1828–1835.
- Petit, F., Arnoult, D., Lelièvre, J.-D., Moutouh-de Parseval, L., Hance, A.J., Schneider, P., Corbeil, J., Ameisen, J.C., and Estaquier, J. (2002). Productive HIV-1 infection of primary CD4+ T cells induces mitochondrial membrane permeabilization leading to a caspase-independent cell death. *J. Biol. Chem.* 277, 1477–1487.
- Petry, H., and Lüke, W. (1997). Infection of macaque monkeys with simian immunodeficiency virus: an animal model for neuro-AIDS. *Intervirology* 40, 112–121.
- Philpott, S.M. (2003). HIV-1 coreceptor usage, transmission, and disease progression. *Curr. HIV Res.* 1, 217–227.
- Piller, S.C., Dubay, J.W., Derdeyn, C.A., and Hunter, E. (2000). Mutational analysis of conserved domains within the cytoplasmic tail of gp41 from human immunodeficiency virus type 1: effects on glycoprotein incorporation and infectivity. *J. Virol.* 74, 11717–11723.
- Pinter, A., Honnen, W.J., Tilley, S.A., Bona, C., Zaghouani, H., Gorny, M.K., and Zolla-Pazner, S. (1989). Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 63, 2674–2679.
- Plymale, D.R., Comardelle, A.M., Fermi, C.D., Martin, D.S., Costin, J.M., Norris, C.H., Tencza, S.B., Mietzner, T.A., Montelaro, R.C., and Garry, R.F. (1999). Concentration-dependent differential induction of necrosis or apoptosis by HIV-1 lytic peptide 1. *Peptides* 20, 1275–1283.
- Pollakis, G., Abebe, A., Kliphuis, A., Chalaby, M.I.M., Bakker, M., Mengistu, Y., Brouwer, M., Goudsmit, J., Schuitemaker, H., and Paxton, W.A. (2004). Phenotypic and genotypic comparisons of CCR5- and CXCR4-tropic human immunodeficiency virus type 1 biological clones isolated from subtype C-infected individuals. *J. Virol.* 78, 2841–2852.
- Pommier, Y., Johnson, A.A., and Marchand, C. (2005). Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov* 4, 236–248.
- Porter, D.P., Kulkarni, R., Garner, W., Miller, M.D., and White, K.L. (2017). Viral blips were infrequent in treatment-naive adults treated with rilpivirine/emtricitabine/tenofovir DF or efavirenz/emtricitabine/tenofovir DF through 96 weeks. *Antivir. Ther. (Lond.)* 22, 495–502.
- Poumbourios, P., el Ahmar, W., McPhee, D.A., and Kemp, B.E. (1995). Determinants of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein oligomeric structure. *J. Virol.* 69, 1209–1218.
- Price, M.N., Dehal, P.S., and Arkin, A.P. (2010). FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLOS ONE* 5, e9490.
- Prins, J.M., Jurriaans, S., van Praag, R.M., Blaak, H., van Rij, R., Schellekens, P.T., ten Berge, I.J., Yong, S.L., Fox, C.H., Roos, M.T., et al. (1999). Immuno-activation with anti-CD3 and recombinant human IL-2 in HIV-1-infected patients on potent antiretroviral therapy. *AIDS* 13, 2405–2410.
- Procopio, F.A., Fromentin, R., Kulpa, D.A., Brehm, J.H., Bebin, A.-G., Strain, M.C., Richman, D.D., O’Doherty, U., Palmer, S., Hecht, F.M., et al. (2015). A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals. *EBioMedicine* 2, 874–883.
- Pulsinelli, G.A., and Temin, H.M. (1991). Characterization of large deletions occurring during a single round of retrovirus vector replication: novel deletion mechanism involving errors in strand transfer. *J. Virol.* 65, 4786–4797.

- Pulsinelli, G.A., and Temin, H.M. (1994). High rate of mismatch extension during reverse transcription in a single round of retrovirus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *91*, 9490–9494.
- Quigley, M.F., Gonzalez, V.D., Granath, A., Andersson, J., and Sandberg, J.K. (2007). CXCR5+ CCR7- CD8 T cells are early effector memory cells that infiltrate tonsil B cell follicles. *Eur. J. Immunol.* *37*, 3352–3362.
- Rabson, A.B., and Lin, H.C. (2000). NF-kappa B and HIV: linking viral and immune activation. *Adv. Pharmacol.* *48*, 161–207.
- Rasmussen, T.A., and Lewin, S.R. (2016). Shocking HIV out of hiding: where are we with clinical trials of latency reversing agents? *Curr Opin HIV AIDS* *11*, 394–401.
- Rasmussen, T.A., Schmeltz Sjøgaard, O., Brinkmann, C., Wightman, F., Lewin, S.R., Melchjorsen, J., Dinarello, C., Østergaard, L., and Tolstrup, M. (2013). Comparison of HDAC inhibitors in clinical development: effect on HIV production in latently infected cells and T-cell activation. *Hum Vaccin Immunother* *9*, 993–1001.
- Rasmussen, T.A., Tolstrup, M., Brinkmann, C.R., Olesen, R., Erikstrup, C., Solomon, A., Winckelmann, A., Palmer, S., Dinarello, C., Buzon, M., et al. (2014). Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *Lancet HIV* *1*, e13-21.
- Rathmell, J.C., and Thompson, C.B. (1999). The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 781–828.
- Ray, P.E., Liu, X.-H., Robinson, L.R., Reid, W., Xu, L., Owens, J.W., Jones, O.D., Denaro, F., Davis, H.G., and Bryant, J.L. (2003). A novel HIV-1 transgenic rat model of childhood HIV-1-associated nephropathy. *Kidney Int.* *63*, 2242–2253.
- Reddy, B., and Yin, J. (1999). Quantitative intracellular kinetics of HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *15*, 273–283.
- Redel, L., Le Douce, V., Cherrier, T., Marban, C., Janossy, A., Aunis, D., Van Lint, C., Rohr, O., and Schwartz, C. (2010). HIV-1 regulation of latency in the monocyte-macrophage lineage and in CD4+ T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* *87*, 575–588.
- Reeves, J.D., and Piefer, A.J. (2005). Emerging drug targets for antiretroviral therapy. *Drugs* *65*, 1747–1766.
- Reuse, S., Calao, M., Kabeya, K., Guiguen, A., Gatot, J.-S., Quivy, V., Vanhulle, C., Lamine, A., Vaira, D., Demonte, D., et al. (2009). Synergistic activation of HIV-1 expression by deacetylase inhibitors and prostratin: implications for treatment of latent infection. *PLoS ONE* *4*, e6093.
- Rhodes, T., Wargo, H., and Hu, W.-S. (2003). High rates of human immunodeficiency virus type 1 recombination: near-random segregation of markers one kilobase apart in one round of viral replication. *J. Virol.* *77*, 11193–11200.
- Roberts, N.A., Martin, J.A., Kinchington, D., Broadhurst, A.V., Craig, J.C., Duncan, I.B., Galpin, S.A., Handa, B.K., Kay, J., and Kröhn, A. (1990). Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science* *248*, 358–361.
- Robertson, D.L., Sharp, P.M., McCutchan, F.E., and Hahn, B.H. (1995). Recombination in HIV-1. *Nature* *374*, 124–126.
- Robillard, K.R., Chan, G.N.Y., Zhang, G., la Porte, C., Cameron, W., and Bendayan, R. (2014). Role of P-glycoprotein in the distribution of the HIV protease inhibitor atazanavir in the brain and male genital tract. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 1713–1722.
- Roggero, R., Robert-Hebmann, V., Harrington, S., Roland, J., Vergne, L., Jaleco, S., Devaux, C.,

- and Biard-Piechaczyk, M. (2001). Binding of human immunodeficiency virus type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling. *J. Virol.* *75*, 7637–7650.
- Rohr, O., Lecestre, D., Chasserot-Golaz, S., Marban, C., Avram, D., Aunis, D., Leid, M., and Schaeffer, E. (2003). Recruitment of Tat to heterochromatin protein HP1 via interaction with CTIP2 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in microglial cells. *J. Virol.* *77*, 5415–5427.
- Rosenberg, E.S., Altfeld, M., Poon, S.H., Phillips, M.N., Wilkes, B.M., Eldridge, R.L., Robbins, G.K., D’Aquila, R.T., Goulder, P.J., and Walker, B.D. (2000). Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* *407*, 523–526.
- Rous, B.A., Reaves, B.J., Ihrke, G., Briggs, J.A.G., Gray, S.R., Stephens, D.J., Banting, G., and Luzio, J.P. (2002). Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol. Biol. Cell* *13*, 1071–1082.
- Rouso, I., Mixon, M.B., Chen, B.K., and Kim, P.S. (2000). Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 13523–13525.
- Routy, J.P., Tremblay, C.L., Angel, J.B., Trottier, B., Rouleau, D., Baril, J.G., Harris, M., Trottier, S., Singer, J., Chomont, N., et al. (2012). Valproic acid in association with highly active antiretroviral therapy for reducing systemic HIV-1 reservoirs: results from a multicentre randomized clinical study. *HIV Med.* *13*, 291–296.
- Rowland-Jones, S. (1999). HIV infection: where have all the T cells gone? *Lancet* *354*, 5–7.
- Rusche, J.R., Javaherian, K., McDanal, C., Petro, J., Lynn, D.L., Grimaila, R., Langlois, A., Gallo, R.C., Arthur, L.O., and Fischinger, P.J. (1988). Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope, gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *85*, 3198–3202.
- Saayman, S., Ackley, A., Turner, A.-M.W., Famiglietti, M., Bosque, A., Clemson, M., Planelles, V., and Morris, K.V. (2014). An HIV-encoded antisense long noncoding RNA epigenetically regulates viral transcription. *Mol. Ther.* *22*, 1164–1175.
- Sachdeva, R., Li, Y., Shilpi, R.Y., and Simm, M. (2015). Human X-DING-CD4 mediates resistance to HIV-1 infection through novel paracrine-like signaling. *FEBS J.* *282*, 937–950.
- Sáez-Cirión, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., Potard, V., Versmisse, P., Melard, A., Prazuck, T., et al. (2013). Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog.* *9*, e1003211.
- Sagar, M., Wu, X., Lee, S., and Overbaugh, J. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J. Virol.* *80*, 9586–9598.
- de Saint-Vis, B., Fugier-Vivier, I., Massacrier, C., Gaillard, C., Vanbervliet, B., Ait-Yahia, S., Banchereau, J., Liu, Y.J., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J. Immunol.* *160*, 1666–1676.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* *401*, 708–712.
- Salzwedel, K., West, J.T., and Hunter, E. (1999). A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J. Virol.* *73*, 2469–

- 2480.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., et al. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722–725.
- Sancineto, L., Iraci, N., Massari, S., Attanasio, V., Corazza, G., Barreca, M.L., Sabatini, S., Manfroni, G., Avanzi, N.R., Cecchetti, V., et al. (2013). Computer-aided design, synthesis and validation of 2-phenylquinazolinone fragments as CDK9 inhibitors with anti-HIV-1 Tat-mediated transcription activity. *ChemMedChem* **8**, 1941–1953.
- Sanyal, A., Mailliard, R.B., Rinaldo, C.R., Ratner, D., Ding, M., Chen, Y., Zerbato, J.M., Giacobbi, N.S., Venkatachari, N.J., Patterson, B.K., et al. (2017). Novel assay reveals a large, inducible, replication-competent HIV-1 reservoir in resting CD4(+) T cells. *Nat. Med.* **23**, 885–889.
- Scheller, C., and Jassoy, C. (2001). Syncytium formation amplifies apoptotic signals: a new view on apoptosis in HIV infection in vitro. *Virology* **282**, 48–55.
- Schröder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521–529.
- Schwartz, O., Alizon, M., Heard, J.M., and Danos, O. (1994). Impairment of T cell receptor-dependent stimulation in CD4+ lymphocytes after contact with membrane-bound HIV-1 envelope glycoprotein. *Virology* **198**, 360–365.
- Schwartz, S., Felber, B.K., Benko, D.M., Fenyö, E.M., and Pavlakis, G.N. (1990). Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **64**, 2519–2529.
- Seng, R., Goujard, C., Desquilbet, L., Sinet, M., Rouzioux, C., Deveau, C., Boufassa, F., Delfraissy, J.-F., Meyer, L., Venet, A., et al. (2008). Rapid CD4+ cell decrease after transient cART initiated during primary HIV infection (ANRS PRIMO and SEROCO cohorts). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **49**, 251–258.
- Serra-Peinado, C., Grau-Expósito, J., Genescà, M., Luque-Ballesteros, L., Astorga, A., Gálvez, C., Castellví, J., Willekens, R., Ocaña, I., Burgos, J., et al. (2017). Productive HIV-1 infection upregulates CD32 in vitro and in vivo. *HIV Persistence during Therapy*.
- Shacklett, B.L., Weber, C.J., Shaw, K.E., Keddie, E.M., Gardner, M.B., Sonigo, P., and Luciw, P.A. (2000). The intracytoplasmic domain of the Env transmembrane protein is a locus for attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac in rhesus macaques. *J. Virol.* **74**, 5836–5844.
- Shang, L., and Hunter, E. (2010). Residues in the membrane-spanning domain core modulate conformation and fusogenicity of the HIV-1 envelope glycoprotein. *Virology* **404**, 158–167.
- Shang, H., Ding, J., Yu, S., Wu, T., Zhang, Q., and Liang, F. (2015). Progress and challenges in the use of latent HIV-1 reactivating agents. *Acta Pharmacol. Sin.* **36**, 908–916.
- Shang, L., Yue, L., and Hunter, E. (2008). Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection. *J. Virol.* **82**, 5417–5428.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., and Malim, M.H. (2003). The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat. Med.* **9**, 1404–1407.
- Sherrill-Mix, S., Lewinski, M.K., Famiglietti, M., Bosque, A., Malani, N., Ocwieja, K.E., Berry, C.C., Looney, D., Shan, L., Agosto, L.M., et al. (2013). HIV latency and integration site

- placement in five cell-based models. *Retrovirology* 10, 90.
- Shioda, T., Levy, J.A., and Cheng-Mayer, C. (1991). Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* 349, 167–169.
- Shioda, T., Oka, S., Ida, S., Nokihara, K., Toriyoshi, H., Mori, S., Takebe, Y., Kimura, S., Shimada, K., and Nagai, Y. (1994). A naturally occurring single basic amino acid substitution in the V3 region of the human immunodeficiency virus type 1 env protein alters the cellular host range and antigenic structure of the virus. *J. Virol.* 68, 7689–7696.
- Shioda, T., Oka, S., Xin, X., Liu, H., Harukuni, R., Kurotani, A., Fukushima, M., Hasan, M.K., Shiino, T., Takebe, Y., et al. (1997). In vivo sequence variability of human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120: association of V2 extension with slow disease progression. *J. Virol.* 71, 4871–4881.
- Siliciano, J.D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J.B., Kovacs, C., Gange, S.J., and Siliciano, R.F. (2003a). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat. Med.* 9, 727–728.
- Siliciano, J.D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J.B., Kovacs, C., Gange, S.J., and Siliciano, R.F. (2003b). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat. Med.* 9, 727–728.
- Silva, C., Zhang, K., Tsutsui, S., Holden, J.K., Gill, M.J., and Power, C. (2003). Growth hormone prevents human immunodeficiency virus-induced neuronal p53 expression. *Ann. Neurol.* 54, 605–614.
- Silvestris, F., Nagata, S., Cafforio, P., Silvestris, N., and Dammacco, F. (1996). Cross-linking of Fas by antibodies to a peculiar domain of gp120 V3 loop can enhance T cell apoptosis in HIV-1-infected patients. *J. Exp. Med.* 184, 2287–2300.
- Smed-Sörensen, A., Loré, K., Vasudevan, J., Louder, M.K., Andersson, J., Mascola, J.R., Spetz, A.-L., and Koup, R.A. (2005). Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J. Virol.* 79, 8861–8869.
- Smith, B.A., Gartner, S., Liu, Y., Perelson, A.S., Stilianakis, N.I., Keele, B.F., Kerkering, T.M., Ferreira-Gonzalez, A., Szakal, A.K., Tew, J.G., et al. (2001). Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 690–696.
- Smith, P.D., Meng, G., Salazar-Gonzalez, J.F., and Shaw, G.M. (2003). Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. *J. Leukoc. Biol.* 74, 642–649.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2009). T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 591–619.
- Soares, M.V., Borthwick, N.J., Maini, M.K., Janossy, G., Salmon, M., and Akbar, A.N. (1998). IL-7-dependent extrathymic expansion of CD45RA+ T cells enables preservation of a naive repertoire. *J. Immunol.* 161, 5909–5917.
- Sodroski, J., Goh, W.C., Rosen, C., Campbell, K., and Haseltine, W.A. (1986). Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 322, 470–474.
- Sodroski, J., Haseltine, W., and Kowalski, M. (1991). Role of the human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein in cytopathic effect. *Adv. Exp. Med. Biol.* 300, 193-199; discussion 200-201.
- Søgaard, O.S., Graversen, M.E., Leth, S., Olesen, R., Brinkmann, C.R., Nissen, S.K., Kjaer, A.S., Schleimann, M.H., Denton, P.W., Hey-Cunningham, W.J., et al. (2015). The Depsipeptide Romidepsin Reverses HIV-1 Latency In Vivo. *PLoS Pathog.* 11, e1005142.
- Somma, F., Tuosto, L., Gilardini Montani, M.S., Di Somma, M.M., Cundari, E., and Piccolella, E. (2000). Engagement of CD4 before TCR triggering regulates both Bax- and Fas (CD95)-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 164, 5078–5087.

- Srinivas, S.K., Srinivas, R.V., Anantharamaiah, G.M., Segrest, J.P., and Compans, R.W. (1992). Membrane interactions of synthetic peptides corresponding to amphipathic helical segments of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. *J. Biol. Chem.* *267*, 7121–7127.
- Stamatatos, L., Morris, L., Burton, D.R., and Mascola, J.R. (2009). Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat. Med.* *15*, 866–870.
- Starcich, B.R., Hahn, B.H., Shaw, G.M., McNeely, P.D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E.S., Parks, W.P., Josephs, S.F., and Gallo, R.C. (1986). Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* *45*, 637–648.
- Starr-Spires, L.D., and Collman, R.G. (2002). HIV-1 entry and entry inhibitors as therapeutic agents. *Clin. Lab. Med.* *22*, 681–701.
- Steckbeck, J.D., Kuhlmann, A.-S., and Montelaro, R.C. (2013). C-terminal tail of human immunodeficiency virus gp41: functionally rich and structurally enigmatic. *J. Gen. Virol.* *94*, 1–19.
- Stevens, M., Pollicita, M., Pannecouque, C., Verbeken, E., Tabarrini, O., Cecchetti, V., Aquaro, S., Perno, C.F., Fravolini, A., De Clercq, E., et al. (2007). Novel in vivo model for the study of human immunodeficiency virus type 1 transcription inhibitors: evaluation of new 6-desfluoroquinolone derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 1407–1413.
- Stevenson, M., Stanwick, T.L., Dempsey, M.P., and Lamonica, C.A. (1990). HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J.* *9*, 1551–1560.
- Stewart, S.A., Poon, B., Jowett, J.B., and Chen, I.S. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *J. Virol.* *71*, 5579–5592.
- Su, B., Wurtzer, S., Rameix-Welti, M.-A., Dwyer, D., van der Werf, S., Naffakh, N., Clavel, F., and Labrosse, B. (2009). Enhancement of the influenza A hemagglutinin (HA)-mediated cell-cell fusion and virus entry by the viral neuraminidase (NA). *PLoS ONE* *4*, e8495.
- Sun, H., Kim, D., Li, X., Kiselina, M., Ouyang, Z., Vandekerckhove, L., Shang, H., Rosenberg, E.S., Yu, X.G., and Lichterfeld, M. (2015). Th1/17 Polarization of CD4 T Cells Supports HIV-1 Persistence during Antiretroviral Therapy. *J. Virol.* *89*, 11284–11293.
- Suo, Z., and Johnson, K.A. (1997). RNA secondary structure switching during DNA synthesis catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Biochemistry* *36*, 14778–14785.
- Swainson, L., Verhoeyen, E., Cosset, F.-L., and Taylor, N. (2006). IL-7R alpha gene expression is inversely correlated with cell cycle progression in IL-7-stimulated T lymphocytes. *J. Immunol.* *176*, 6702–6708.
- Sylwester, A., Murphy, S., Shutt, D., and Soll, D.R. (1997). HIV-induced T cell syncytia are self-perpetuating and the primary cause of T cell death in culture. *J. Immunol.* *158*, 3996–4007.
- Symons, J., Chopra, A., Leary, S., Cooper, D., Anderson, J.L., Chang, J.J., McMahon, J., Deeks, S.G., Mallal, S., Cameron, P.U., et al. (2017). HIV integration sites in CD4 T cells from virally suppressed individuals show clonal expansion but no preferential location in oncogenes. *IAS*.
- Tabarrini, O., Massari, S., Daelemans, D., Stevens, M., Manfroni, G., Sabatini, S., Balzarini, J., Cecchetti, V., Pannecouque, C., and Fravolini, A. (2008). Structure-activity relationship study on anti-HIV 6-desfluoroquinolones. *J. Med. Chem.* *51*, 5454–5458.
- Takeya, M., Naito, M., Eto, K., and Takahashi, K. (1991). Immunohistochemical characterization of multinucleated giant cells in the brain of a Japanese AIDS patient. *Acta*

- Pathol. Jpn. *41*, 212–216.
- Tan, K., Liu, J., Wang, J., Shen, S., and Lu, M. (1997). Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 12303–12308.
- Tanchot, C., Rosado, M.M., Agenes, F., Freitas, A.A., and Rocha, B. (1997). Lymphocyte homeostasis. *Semin. Immunol.* *9*, 331–337.
- Tanchot, C., Le Campion, A., Martin, B., Léaument, S., Dautigny, N., and Lucas, B. (2002). Conversion of naive T cells to a memory-like phenotype in lymphopenic hosts is not related to a homeostatic mechanism that fills the peripheral naive T cell pool. *J. Immunol.* *168*, 5042–5046.
- Tanenbaum, M.E., Gilbert, L.A., Qi, L.S., Weissman, J.S., and Vale, R.D. (2014). A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell* *159*, 635–646.
- Tateyama, M., Oyaizu, N., McCloskey, T.W., Than, S., and Pahwa, S. (2000). CD4 T lymphocytes are primed to express Fas ligand by CD4 cross-linking and to contribute to CD8 T-cell apoptosis via Fas/FasL death signaling pathway. *Blood* *96*, 195–202.
- Taura, M., Kudo, E., Kariya, R., Goto, H., Matsuda, K., Hattori, S., Vaeteewoottacharn, K., McDonald, F., Suico, M.A., Shuto, T., et al. (2015). COMMD1/Murr1 reinforces HIV-1 latent infection through I κ B- α stabilization. *J. Virol.* *89*, 2643–2658.
- Tencza, S.B., Mietzner, T.A., and Montelaro, R.C. (1997). Calmodulin-binding function of LLP segments from the HIV type 1 transmembrane protein is conserved among natural sequence variants. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *13*, 263–269.
- Theos, A.C., Tenza, D., Martina, J.A., Hurbain, I., Peden, A.A., Sviderskaya, E.V., Stewart, A., Robinson, M.S., Bennett, D.C., Cutler, D.F., et al. (2005). Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol. Biol. Cell* *16*, 5356–5372.
- Thierry, S., Munir, S., Thierry, E., Subra, F., Leh, H., Zamborlini, A., Saenz, D., Levy, D.N., Lesbats, P., Saïb, A., et al. (2015). Integrase inhibitor reversal dynamics indicate unintegrated HIV-1 dna initiate de novo integration. *Retrovirology* *12*, 24.
- Thompson, M.A., Aberg, J.A., Hoy, J.F., Telenti, A., Benson, C., Cahn, P., Eron, J.J., Günthard, H.F., Hammer, S.M., Reiss, P., et al. (2012). Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA* *308*, 387–402.
- Tiefendbrunn, T., and Stout, C.D. (2014). Towards novel therapeutics for HIV through fragment-based screening and drug design. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *116*, 124–140.
- Tien, P.C., Choi, A.I., Zolopa, A.R., Benson, C., Scherzer, R., Bacchetti, P., Shlipak, M., and Grunfeld, C. (2010). Inflammation and Mortality in HIV-infected Adults: Analysis of the FRAM Study Cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* *55*, 316–322.
- Tobiume, M., Fujinaga, K., Suzuki, S., Komoto, S., Mukai, T., and Ikuta, K. (2002). Extracellular Nef protein activates signal transduction pathway from Ras to mitogen-activated protein kinase cascades that leads to activation of human immunodeficiency virus from latency. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *18*, 461–467.
- Torres-Cornejo, A., Benmarzouk-Hidalgo, O.J., Gutiérrez-Valencia, A., Pérez-Romero, P., Martín-Peña, R., Ruiz-Valderas, R., Viciano, P., and Lopez-Cortes, L.F. (2014). Cellular HIV reservoir replenishment is not affected by blip or intermittent viremia episodes during darunavir/ritonavir monotherapy. *AIDS* *28*, 201–208.
- Tsuchihashi, Z., and Brown, P.O. (1994). DNA strand exchange and selective DNA annealing promoted by the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J. Virol.* *68*,

- 5863–5870.
- Twu, C., Liu, N.Q., Popik, W., Bukrinsky, M., Sayre, J., Roberts, J., Rania, S., Bramhandam, V., Roos, K.P., MacLellan, W.R., et al. (2002). Cardiomyocytes undergo apoptosis in human immunodeficiency virus cardiomyopathy through mitochondrion- and death receptor-controlled pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 14386–14391.
- Vago, L., Castagna, A., Lazzarin, A., Trabattoni, G., Cinque, P., and Costanzi, G. (1993). Reduced frequency of HIV-induced brain lesions in AIDS patients treated with zidovudine. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *6*, 42–45.
- Valcour, V., Chalermchai, T., Sailasuta, N., Marovich, M., Lerdlum, S., Suttichom, D., Suwanwela, N.C., Jagodzinski, L., Michael, N., Spudich, S., et al. (2012). Central nervous system viral invasion and inflammation during acute HIV infection. *J. Infect. Dis.* *206*, 275–282.
- Vanitharani, R., Mahalingam, S., Rafaei, Y., Singh, S.P., Srinivasan, A., Weiner, D.B., and Ayyavoo, V. (2001). HIV-1 Vpr transactivates LTR-directed expression through sequences present within -278 to -176 and increases virus replication in vitro. *Virology* *289*, 334–342.
- Varela-Rohena, A., Molloy, P.E., Dunn, S.M., Li, Y., Suhoski, M.M., Carroll, R.G., Milicic, A., Mahon, T., Sutton, D.H., Laugel, B., et al. (2008). Control of HIV-1 immune escape by CD8 T cells expressing enhanced T-cell receptor. *Nat. Med.* *14*, 1390–1395.
- Vasconcelos, I.M., and Oliveira, J.T.A. (2004). Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon* *44*, 385–403.
- Velu, V., Shetty, R.D., Larsson, M., and Shankar, E.M. (2015). Role of PD-1 co-inhibitory pathway in HIV infection and potential therapeutic options. *Retrovirology* *12*, 14.
- Venable, R.M., Pastor, R.W., Brooks, B.R., and Carson, F.W. (1989). Theoretically determined three-dimensional structures for amphipathic segments of the HIV-1 gp41 envelope protein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *5*, 7–22.
- Verhoef, K., Sanders, R.W., Fontaine, V., Kitajima, S., and Berkhout, B. (1999). Evolution of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat promoter by conversion of an NF-kappaB enhancer element into a GABP binding site. *J. Virol.* *73*, 1331–1340.
- Vigorito, M., Connaghan, K.P., and Chang, S.L. (2015). The HIV-1 transgenic rat model of neuroHIV. *Brain Behav. Immun.* *48*, 336–349.
- Vlahakis, S.R., Villasis-Keever, A., Gomez, T.S., Bren, G.D., and Paya, C.V. (2003). Human immunodeficiency virus-induced apoptosis of human hepatocytes via CXCR4. *J. Infect. Dis.* *188*, 1455–1460.
- Voss, T.G., Fermin, C.D., Levy, J.A., Vigh, S., Choi, B., and Garry, R.F. (1996a). Alteration of intracellular potassium and sodium concentrations correlates with induction of cytopathic effects by human immunodeficiency virus. *J. Virol.* *70*, 5447–5454.
- Voss, T.G., Gatti, P.J., Fermin, C.D., and Garry, R.F. (1996b). Reduction of human immunodeficiency virus production and cytopathic effects by inhibitors of the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter. *Virology* *219*, 291–294.
- Wagner, T.A., McLaughlin, S., Garg, K., Cheung, C.Y.K., Larsen, B.B., Styrchak, S., Huang, H.C., Edlefsen, P.T., Mullins, J.I., and Frenkel, L.M. (2014). HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science* *345*, 570–573.
- Walker, D.K., Abel, S., Comby, P., Muirhead, G.J., Nedderman, A.N.R., and Smith, D.A. (2005). Species differences in the disposition of the CCR5 antagonist, UK-427,857, a new potential treatment for HIV. *Drug Metab. Dispos.* *33*, 587–595.
- Wan, Z., and Chen, X. (2014). Triptolide inhibits human immunodeficiency virus type 1

- replication by promoting proteasomal degradation of Tat protein. *Retrovirology* **11**, 88.
- Wang, J.K., Kiyokawa, E., Verdin, E., and Trono, D. (2000). The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 394–399.
- Wang, L., Mukherjee, S., Jia, F., Narayan, O., and Zhao, L.J. (1995). Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *J. Biol. Chem.* **270**, 25564–25569.
- Wang, W., Ye, C., Liu, J., Zhang, D., Kimata, J.T., and Zhou, P. (2014). CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. *PLoS ONE* **9**, e115987.
- Watanabe, M., Nakashima, M., Togano, T., Higashihara, M., Watanabe, T., Umezawa, K., and Horie, R. (2008). Identification of the RelA domain responsible for action of a new NF-kappaB inhibitor DHMEQ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 310–314.
- Wei, D.G., Chiang, V., Fyne, E., Balakrishnan, M., Barnes, T., Graupe, M., Hesselgesser, J., Irrinki, A., Murry, J.P., Stepan, G., et al. (2014). Histone deacetylase inhibitor romidepsin induces HIV expression in CD4 T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy at concentrations achieved by clinical dosing. *PLoS Pathog.* **10**, e1004071.
- Weinberger, L.S., Burnett, J.C., Toettcher, J.E., Arkin, A.P., and Schaffer, D.V. (2005). Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: HIV-1 Tat fluctuations drive phenotypic diversity. *Cell* **122**, 169–182.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S.C., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426–430.
- Welman, M., Lemay, G., and Cohen, E.A. (2007). Role of envelope processing and gp41 membrane spanning domain in the formation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) fusion-competent envelope glycoprotein complex. *Virus Res.* **124**, 103–112.
- Wiegand, A., Spindler, J., Hong, F.F., Shao, W., Cyktor, J.C., Cillo, A.R., Halvas, E.K., Coffin, J.M., Mellors, J.W., and Kearney, M.F. (2017). Single-cell analysis of HIV-1 transcriptional activity reveals expression of proviruses in expanded clones during ART. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E3659–E3668.
- Wilk, T., Pfeiffer, T., and Bosch, V. (1992). Retained in vitro infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product. *Virology* **189**, 167–177.
- Willey, R.L., Rutledge, R.A., Dias, S., Folks, T., Theodore, T., Buckler, C.E., and Martin, M.A. (1986). Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5038–5042.
- Wilson, D.H., Rissin, D.M., Kan, C.W., Fournier, D.R., Piech, T., Campbell, T.G., Meyer, R.E., Fishburn, M.W., Cabrera, C., Patel, P.P., et al. (2016). The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing. *J Lab Autom* **21**, 533–547.
- Wong, T.C. (2003). Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion peptide by molecular dynamics simulation. II. The glycine mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **1609**, 45–54.
- Wong, J.K., Hezareh, M., Günthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Spina, C.A., and Richman, D.D. (1997). Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* **278**, 1291–1295.
- Wu, S.-R., Löving, R., Lindqvist, B., Hebert, H., Koeck, P.J.B., Sjöberg, M., and Garoff, H. (2010). Single-particle cryoelectron microscopy analysis reveals the HIV-1 spike as a tripod

- structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 18844–18849.
- Wyatt, R., and Sodroski, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* *280*, 1884–1888.
- Wyss, S., Berlioz-Torrent, C., Boge, M., Blot, G., Höning, S., Benarous, R., and Thali, M. (2001). The highly conserved C-terminal dileucine motif in the cytosolic domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is critical for its association with the AP-1 clathrin adaptor [correction of adapter]. *J. Virol.* *75*, 2982–2992.
- Xu, Y., Kulkosky, J., Acheampong, E., Nunnari, G., Sullivan, J., and Pomerantz, R.J. (2004). HIV-1-mediated apoptosis of neuronal cells: Proximal molecular mechanisms of HIV-1-induced encephalopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 7070–7075.
- Yamamoto, M., Horie, R., Takeiri, M., Kozawa, I., and Umezawa, K. (2008). Inactivation of NF-kappaB components by covalent binding of (-)-dehydroxymethylepoxyquinomicin to specific cysteine residues. *J. Med. Chem.* *51*, 5780–5788.
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., and Huang, H.W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* *81*, 1475–1485.
- Yang, P., Ai, L.-S., Huang, S.-C., Li, H.-F., Chan, W.-E., Chang, C.-W., Ko, C.-Y., and Chen, S.S.-L. (2010). The cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41 harbors lipid raft association determinants. *J. Virol.* *84*, 59–75.
- Ye, L., Wang, J., Beyer, A.I., Teque, F., Cradick, T.J., Qi, Z., Chang, J.C., Bao, G., Muench, M.O., Yu, J., et al. (2014). Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Δ32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 9591–9596.
- Yerly, S., Kaiser, L., Perneger, T.V., Cone, R.W., Opravil, M., Chave, J.P., Furrer, H., Hirschel, B., and Perrin, L. (2000). Time of initiation of antiretroviral therapy: impact on HIV-1 viraemia. The Swiss HIV Cohort Study. *AIDS* *14*, 243–249.
- Zack, J.A., Arrigo, S.J., Weitsman, S.R., Go, A.S., Haislip, A., and Chen, I.S. (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* *61*, 213–222.
- Zack, J.A., Haislip, A.M., Krogstad, P., and Chen, I.S. (1992). Incompletely reverse-transcribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle. *J Virol* *66*, 1717–1725.
- Zapata, J.C., Campilongo, F., Barclay, R.A., DeMarino, C., Iglesias-Ussel, M.D., Kashanchi, F., and Romerio, F. (2017). The Human Immunodeficiency Virus 1 ASP RNA promotes viral latency by recruiting the Polycomb Repressor Complex 2 and promoting nucleosome assembly. *Virology* *506*, 34–44.
- Zhang, Y., Yin, C., Zhang, T., Li, F., Yang, W., Kaminski, R., Fagan, P.R., Putatunda, R., Young, W.-B., Khalili, K., et al. (2015). CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Sci Rep* *5*, 16277.
- Zhen, A., Carrillo, M.A., and Kitchen, S.G. (2017). Chimeric antigen receptor engineered stem cells: a novel HIV therapy. *Immunotherapy* *9*, 401–410.
- Zhou, T., Xu, L., Dey, B., Hessel, A.J., Van Ryk, D., Xiang, S.-H., Yang, X., Zhang, M.-Y., Zwick, M.B., Arthos, J., et al. (2007). Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* *445*, 732–737.
- Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Chertova, E., Lifson, J.D., Grisé, H., Ofek, G.A., Taylor, K.A., and Roux, K.H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes.

Nature 441, 847–852.

Zhu, T., Muthui, D., Holte, S., Nickle, D., Feng, F., Brodie, S., Hwangbo, Y., Mullins, J.I., and Corey, L. (2002). Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* 76, 707–716.

Zwick, M.B., Labrijn, A.F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E.O., Binley, J.M., Moore, J.P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D.R., et al. (2001). Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41. *J. Virol.* 75, 10892–10905.

Annexes



Genetically Intact but Functionally Impaired HIV-1 Env Glycoproteins in the T-Cell Reservoir

Anne de Verneuil,^a Julie Migraine,^a Fabrizio Mammano,^a Jean-Michel Molina,^{a,b} Sébastien Gallien,^{a,b} Hugo Mouquet,^c Allan J. Hance,^a François Clavel,^{a,b} Jacques Dutrieux^a

^aInserm U941, Institut Universitaire d'Hématologie, Université Paris-Diderot, Université Sorbonne Paris-Cité, Paris, France

^bService des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

^cDépartement d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France

ABSTRACT HIV-infected subjects under antiretroviral treatment (ART) harbor a persistent viral reservoir in resting CD4⁺ T cells, which accounts for the resurgence of HIV replication after ART interruption. A large majority of HIV reservoir genomes are genetically defective, but even among intact proviruses few seem able to generate infectious virus. To understand this phenomenon, we examined the function and expression of HIV envelope glycoproteins reactivated from the reservoir of four HIV-infected subjects under suppressive ART. We studied full-length genetically intact *env* sequences from both replicative viruses and cell-associated mRNAs. We found that these Env proteins varied extensively in fusogenicity and infectivity, with strongest functional defects found in Envs from cell-associated mRNAs. Env functional impairments were essentially explained by defects in Env protein expression. Our results support the idea that defects in HIV Env expression, preventing cytopathic or immune HIV clearance, contribute to the persistence of the HIV T-cell reservoir *in vivo*.

IMPORTANCE In most individuals, evolution of HIV infection is efficiently controlled on the long-term by combination antiviral therapies. These treatments, however, fail to eradicate HIV from the infected subjects, a failure that results both in resurgence of virus replication and in resumption of HIV pathogenicity when the treatment is stopped. HIV resurgence, in these instances, is widely assumed to emerge from a reservoir of silent virus integrated in the genomes of a small number of T lymphocytes. The silent HIV reservoir is mostly composed of heavily deleted or mutated HIV DNA. Moreover, among the seemingly intact remaining HIV, only very few are actually able to efficiently propagate in tissue culture. In this study, we find that intact HIV in the reservoir often carry strong defects in their capacity to promote fusion to neighboring cells and infection of target cells, a defect related to the function and expression of the HIV envelope glycoprotein. Impaired envelope glycoprotein expression and function could explain why cells harboring these viruses tend to remain undetected and unharmed in the reservoir.

KEYWORDS HIV, envelope function, reservoir

Combination antiretroviral treatment (ART) efficiently blocks propagative infection of the human immunodeficiency virus (HIV) in infected individuals, leading to significant immune reconstitution associated with remarkably low levels of circulating virus (1, 2). In these subjects, however, ART fails to fully eliminate the virus, since treatment interruption results in most cases in rapid resurgence of active HIV replication, rebound in viremia, and consequent loss of CD4⁺ T cells (3, 4). Failure of ART to

Received 6 October 2017 Accepted 20 November 2017

Accepted manuscript posted online 29 November 2017

Citation de Verneuil A, Migraine J, Mammano F, Molina J-M, Gallien S, Mouquet H, Hance AJ, Clavel F, Dutrieux J. 2018. Genetically intact but functionally impaired HIV-1 Env glycoproteins in the T-cell reservoir. *J Virol* 92:e01684-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01684-17>.

Editor Guido Silvestri, Emory University

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to François Clavel, francois.clavel@inserm.fr.

eradicate HIV from treated individuals is recognized as being largely caused by the persistence of a nonreplicating reservoir of integrated viral genomes in resting T cells (3–8).

Several studies on the nature of the HIV T-cell reservoir have revealed that the vast majority of integrated HIV genomes in resting T cells are genetically defective, carrying either large deletions or stretches of lethal A-to-G mutations induced by the APOBEC3G restriction factor (9, 10). Recent estimates show that up to 95% of integrated HIV genomes in the reservoir are genetically defective (10). In addition to these obvious genetic defects, it is consistently found that only a small fraction of the remaining intact HIV genomes actually produce infectious virus upon T-cell stimulation, as measured by the use of quantitative virus outgrowth assays (qVOA), in which resting CD4⁺ T cells from treated subjects are activated *in vitro* by different stimuli, followed by cocultivation of stimulated cells in limiting dilution conditions with HIV-susceptible target cells (9, 11).

Several mechanisms could explain the quantitative gap between the amount of genetically intact proviruses and the amount of recoverable infectious viruses from the reservoir. One proposed mechanism is that this gap is stochastic in nature and is not influenced by the possible existence of genetically intact, yet poorly infectious HIV genomes in the reservoir (9). Another would be that some of the genetically intact proviruses in the resting T-cell reservoir are integrated in regions of the human genome or at sites where DNA and chromatin conditioning make it difficult for standard *in vitro* culture stimuli to promote full reactivation and further propagation of infectious HIV (12–14).

In an attempt to further explore the nature of the HIV T-cell reservoir and to explain the gap between the number of intact proviruses and the number of infectious viruses that can be recovered from the reservoir, we studied the function of the HIV envelope glycoproteins (Env) expressed following activation of resting CD4⁺ T cells from subjects receiving fully suppressive ART. Env is considered both as a major target for the host immune response during HIV infection (15–18) and as a strong effector of cell death in CD4⁺ T cells that are actively infected by HIV (19–21). For both of these reasons, the persistence and stability of T cells carrying HIV genomes in the reservoir is conditioned to low levels of expression and/or function of HIV Env. Our data indicate that indeed, a substantial fraction of Envs expressed from the resting CD4⁺ T-cell reservoir following *in vitro* stimulation are apparently intact yet functionally impaired. Env functional impairment was found to be essentially related to the amount of Env protein expressed as a whole and at the surfaces of cells. This phenotype was mainly seen in Env proteins derived from T cell-associated mRNAs, while Envs from replicative viruses isolated by qVOA were generally more competent. Impairment of Env expression and fusogenicity in a large fraction of cells in the T-cell HIV reservoir could explain at least in part the persistence of cells harboring these viral genes *in vivo*. They support a model in which expression of functional HIV Env plays a notable role in the selection of cells that survive active HIV infection and accumulate to constitute the persistent HIV T-cell reservoir *in vivo*.

RESULTS

Study subjects. We studied four subjects infected with HIV-1 subtype B. All four subjects had received fully suppressive ART for at least 4 years; the characteristics of each subject are summarized in Table 1. There were notable differences in treatment history between these four subjects. Subject 14 was treated the earliest, having received fully suppressive ART 1 year after having last been found negative for HIV. Subjects 7 and 10 were both treated 4 years after being diagnosed with HIV. The longest histories of untreated infection and on-treatment (whether fully suppressive or not) infection were both found with subject 19, who had been treated unsuccessfully for 10 years, receiving different nonsuppressive treatment regimens, before the availability of potent antiretroviral drugs with absence or reduced exposure to cross-

TABLE 1 Subject characteristics

Subject	Duration (yr)			Latest no. of CD4 cells/mm ³	qVOA IUPM ^a
	HIV before ART	On ART	Undetectable		
7	4	8	8	482	0.73
10	4	5	5	840	1.72
14	<1	4	4	1,015	1.21
19	>10	>15	13	933	1.78

^aIUPM, infectious units per million resting CD4⁺ T cells.

resistance induced by previously prescribed antiretrovirals permitted a full suppression of viral replication.

Genetic analysis of mRNA- and qVOA virus-derived HIV-1 *env* sequences. After isolation of resting CD4⁺ T cells, the cells were stimulated and then subjected in parallel to mRNA extraction and to limiting dilution cocultures with HIV-susceptible target cells for qVOA (9, 11) (Fig. 1). PCR amplification of *env* sequences from both sources did not reveal the presence of any internal Env deletions data not shown, supporting the fact that *env* sequences amplified from mRNAs were either from full-length HIV genomes or from genomes in which deletions and mutations had spared the Env coding sequence itself, together with all of the *cis*- and *trans*-acting HIV sequences required for expression and stability of genome-length or singly spliced Env-encoding mRNAs.

Phylogenetic analysis of both cell-associated mRNAs coding for full-length Env and *env* sequences recovered from replicative qVOA viruses, obtained through alignment of *env* sequences from all four subjects, is presented in Fig. 2. All *env* sequences derived from qVOA viruses were genetically intact, as was the majority of mRNA-derived *env* sequences. A significant proportion (26%) of mRNA-derived *env* genes, however, carried lethal stop codon mutations, most of them the likely consequence of APOBEC3G-induced DNA editing. In line with earlier findings, *env* diversity appeared to closely reflect the time of infection before ART in each subject. Subject 14, infected less than a year before ART, had the lowest sequence diversity (average paired distance = 0.6%). Subject 19, who had been infected with HIV for the most years, whether on or off treatment, also had the largest sequence diversity (4.8%), while subjects 7 and 10, who had comparable time periods before treatment, showed the same extent of *env*

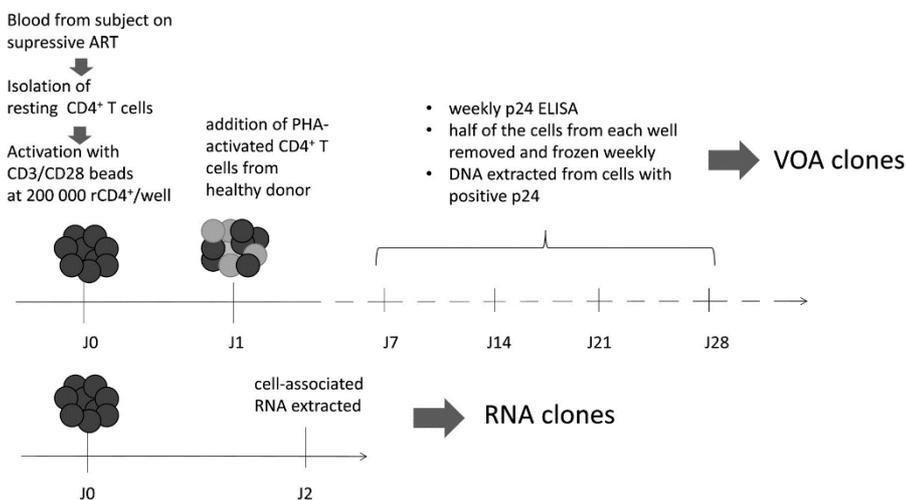


FIG 1 Procedures followed to isolate Env-expressing clones in parallel from qVOA viruses and from cell-associated mRNAs.

de Verneuil et al.

Journal of Virology

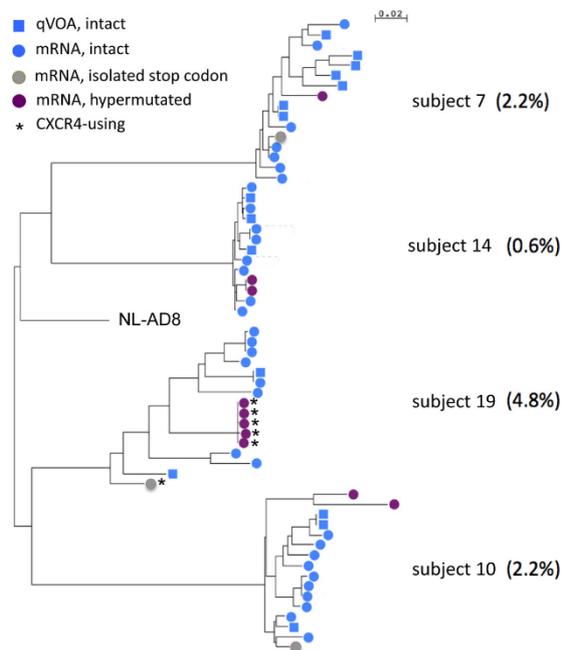


FIG 2 Phylogenetic analysis of mRNA- and qVOA virus-derived HIV-1 *env* sequences. The analysis of *env* genes used in this study was generated by ClustalW alignment of nucleotide sequences, and a phylogenetic tree was constructed using maximum likelihood by FastTree and Newick display. Cell-associated mRNAs coding for full-length Env are shown as circles, and *env* sequences recovered from replicative qVOA viruses are shown as squares for each of the four subjects in the study. The percentages indicated in brackets represent the average pairwise distances within the population of *env* sequences for each subject. Intact sequences are shown in blue, G>A hypermutated sequences are shown in purple, and sequences containing a STOP codon are in gray. CXCR4-using viruses are annotated with a star (dual X4/R5 tropism was computed using the G2P algorithm) (25).

diversity (2.2%). In spite of the limited size of the collection of sequences analyzed here, *env* populations from all four subjects showed signs of clonal expansions, a hallmark of HIV sequences from the HIV T-cell reservoir that has been highlighted by a number of recent studies (22–24). CCR5 and CXCR4 tropism was computed using the Geno2Pheno (G2P) algorithm (25). Dual- or X4-tropic *env* sequences were only found in subject 19, most notably in a cluster of near-identical sequences likely to result from clonal T-cell expansion. Of note, all of these X4-using *env* genes were mutated and nonfunctional.

Functional analysis of Env fusogenicity. The prime function of HIV Env is to promote fusion of the viral membrane with the host cell membrane, following interaction of Env with the CD4 and with the CCR5 and/or CXCR4 receptors. Therefore, we opted to evaluate Env function using a previously described CD4- and CCR5-dependent cell-cell fusion assay in which Env is expressed in cells that have been engineered to stably express the HIV Tat transactivating protein. Env fusogenic capacity is measured using indicator TZM.BL cells, which express CD4 and CCR5 and harbor an HIV LTR-LacZ expression cassette that is dependent on Tat for expression of β -galactosidase. In this system, Env-mediated cell-cell fusion makes it possible for Tat to access the indicator *LacZ* gene, whose expression levels in the culture has proven to be a quantitative reflection of Env fusogenicity (26). Of note, only genetically intact *env* sequences were tested in this assay and in assays described further in this report.

In Fig. 3, Env fusogenicity is shown separately for each subject and is expressed as a percentage of the fusogenicity measured for control R5-tropic NL-AD8 Env. Marked

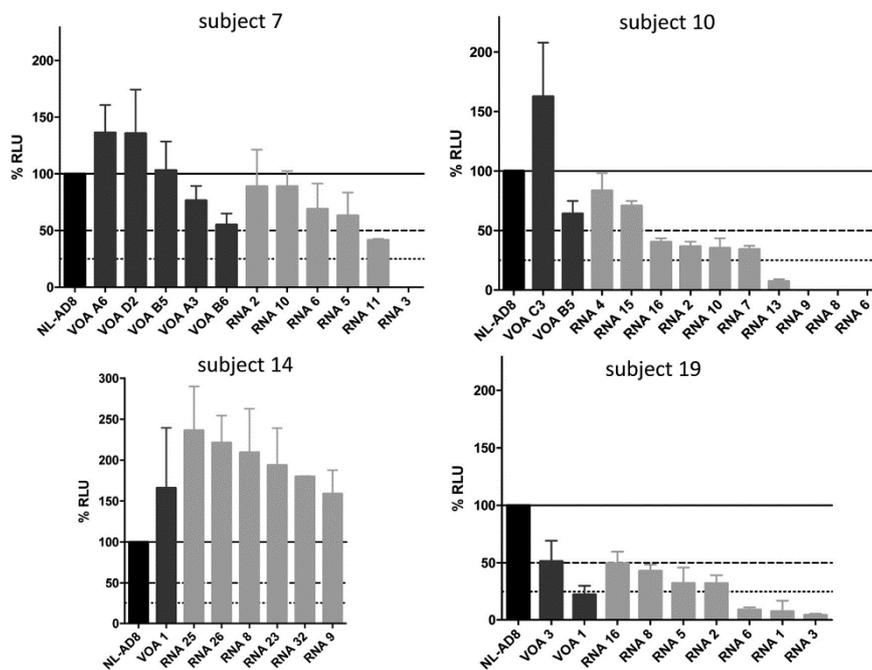


FIG 3 Functional analysis of Env fusogenicity. HeLa Tat cells transfected by pCGCG *env* sequences from each subject were cocultured with TZM.BL cells. Results are presented as % of the relative light units (RLU) measured for positive-control pNL-AD8. Fusogenicity values of Env from cell-associated mRNAs are shown in dark gray, while fusogenicity values of qVOA virus-derived Envs are shown in light gray.

differences in Env fusogenicity were seen between subjects and within Env sequences from each subject. In subject 14, who exhibited the less diverse population of Env sequences, all tested Envs showed a fusogenic capacity that was comparable, if not superior, to that of NL-AD8. In the three other subjects, however, a markedly different profile was observed. In subject 7, although only one mRNA-derived Env appeared nonfusogenic, most mRNA-derived Env clones expressed a fusogenic level that was lower or near 50% of control Env. In subject 10, only two mRNA-derived Envs expressed fusogenicity above 50% of control, with three Env clones devoid of any measurable fusion ability. In subject 19, only one qVOA-derived Env clone expressed fusogenicity above 50% of the control, with five mRNA-derived Env clones expressing remarkably low fusogenicity. Overall, fusion capacity above 50% was observed in 90% of the qVOA-derived clones, whereas this was the case for only 41% of mRNA-derived Env clones. A proportion of mRNA-derived Envs of 27.5% failed to reach a fusogenic level above 25% of control, and a proportion of 14% expressed no detectable fusogenic activity. When fusogenicity phenotypes were superposed to the individual phylogenetic trees of the *env* sequence from each subject, we found that impairment in fusogenicity did not follow any particular genetic clustering pattern (Fig. 4). However, qVOA virus-derived Envs tended to be more fusogenic than mRNA-derived Envs, even when taking into account the high fusogenicity of mRNA-derived Envs from subject 14 ($P = 0.0580$, Fig. 5A). When subject 14 was excluded from this analysis, the difference between qVOA virus- and mRNA-derived Envs was much stronger. Comparing the infectivities of pseudotypes expressing Envs from a panel of different clones also demonstrated large differences between clones, with a significantly higher infectivity in

de Verneuil et al.

Journal of Virology

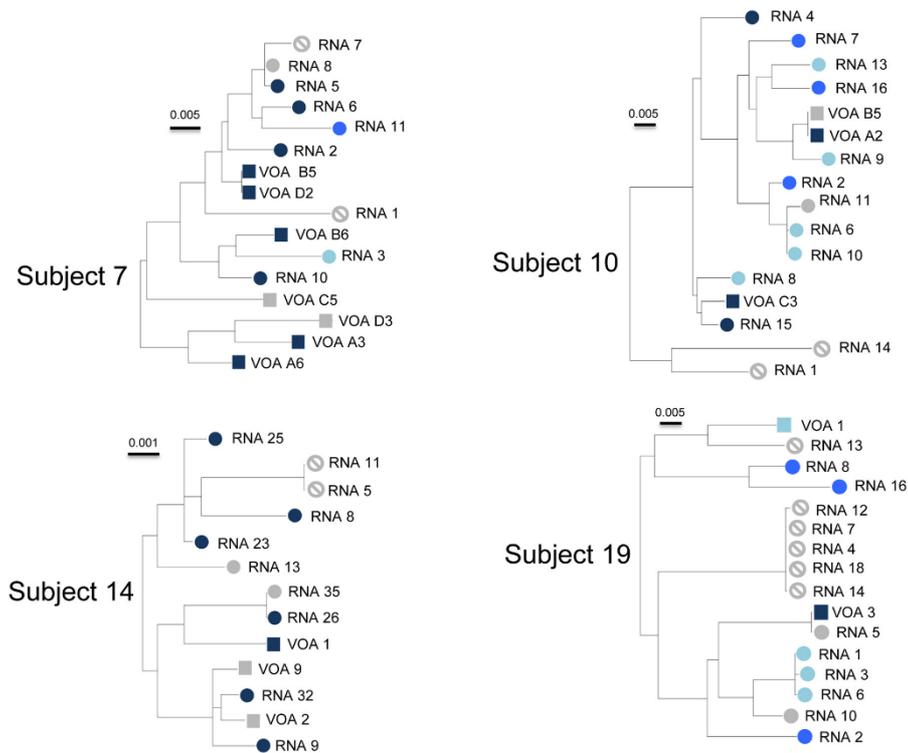


FIG 4 Phylogenetic cluster analysis of mRNA- and qVOA virus-derived HIV-1 Env. Analysis of *env* genes used in this study was generated by ClustalW alignment of nucleotide sequences and a phylogenetic tree was constructed using maximum likelihood by FastTree and Newick display. Cell-associated mRNAs coding for full-length Env are shown as circles and *env* sequences recovered from replicative qVOA viruses are shown as squares for each of the four subjects in the study. Env fusion capacities above 50% (in dark blue) or above 25% (in blue) or with any measurable fusion ability (in light blue) were genetically intact. Untested Envs are indicated in gray, and genetically impaired sequences are indicated in striped gray. The identity and origin of each clone is shown.

qVOA virus-derived Envs, which we surmise may be partly due to the absence of any clones from subject 14 from this panel. These findings support the idea that the emergence of readily replicative virus through the qVOA experimental setting may be related in part to the higher fusogenicity of Envs expressed by these viruses, compared to intact Env sequenced derived from the bulk of mRNAs expressed in stimulated reservoir cells. It cannot be excluded, however, that the emergence of qVOA viruses is facilitated by very early adaptive changes that enhance their infectivity. Strong differences in Env function between clones was also observed using a standard HIV Env pseudotype assay, using a delta Env pNL4-3 luciferase vector, on a limited subset of Env clones (Fig. 5B). Taken together, these data confirm that a substantial fraction of HIV genomes in the T-cell reservoir, in spite of being apparently intact genetically, exhibit moderate to strong defects in Env function.

Expression of reservoir-derived Env sequences. To evaluate whether the impaired capacity observed for several of the Env proteins studied here were related to a purely functional defect or to a defect in protein production, total Env expression was studied by Western blotting and cell surface Env expression was measured by flow cytometry in transfected HeLa cells. Primary anti-Env antibodies were constituted by a mix of several human monoclonal antibodies previously found as being able to

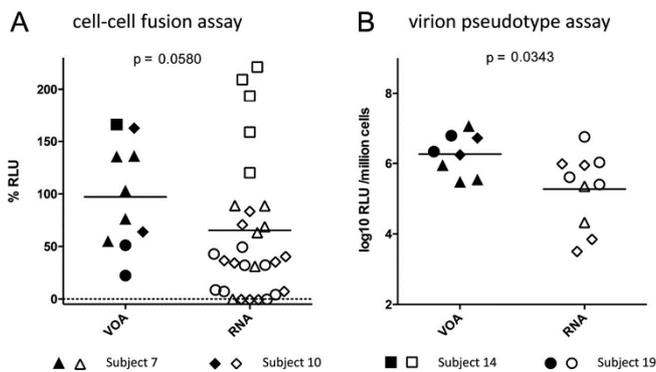


FIG 5 (A) Comparison of fusogenicity by qVOA virus- and cell-associated mRNA-derived Envs. A statistical comparison was performed using the Mann-Whitney test. Different symbols were used for clones obtained from different participants. (B) Comparison of infectivity of pseudotypes expressing Envs from a panel of clones, according to whether they were obtained from qVOA or from cell-associated RNA. Pseudotype particles were produced on 293T cells after cotransfection of pNL4.3 delta Env and pCGCG plasmids expressing different reservoir-derived *env* sequences. TZ.MBL cells were infected by these pseudoparticles, and the RLU values were measured at 2 days postinfection. Symbols are as defined in panel A and reflect the origins of the clones.

recognize Env from most primary HIV-1 strains (16, 27). Figure 6A shows a Western blot of 14 reservoir-derived Env proteins, a panel of clones that was chosen as representative of the wide scale of fusogenicity and infectivity values examined among all Env proteins studied above. Both VOA-derived and cell-associated mRNA-derived HIV sequences were included. As can be seen in Fig. 6A, we observed marked differences in levels of gp160 and gp120 expression within this panel. A few clones expressed levels of Env glycoproteins comparable to NL-AD8 control: all of these clones also expressed normal fusogenicity and infectivity values. Overall, we found a strong correlation between the level of Env production and fusogenicity ($P = 0.0004$, $r = 0.8108$ Fig. 6B).

We next examined the extent that Env proteins were expressed at the surface of transfected cells using flow cytometry. The same mix of monoclonal antibodies was used as in Western blots. Again, the same panel of Envs representative of the spectrum of fusogenicity were transfected in HeLa cells and the proportion of transfected cells

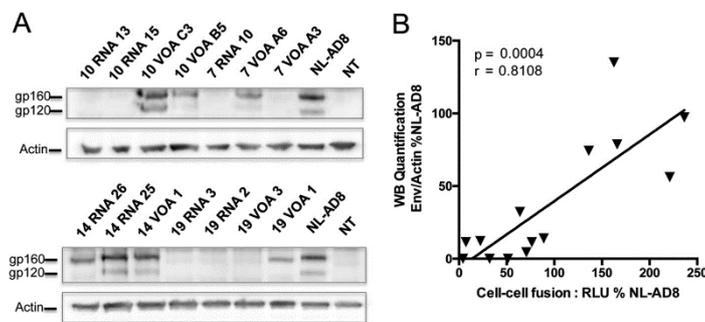


FIG 6 Western blot analysis of mRNA- and qVOA virus-derived HIV-1 *env* expression. (A) HeLa 273 TAT cells were transfected by pCGCG plasmids expressing different reservoir-derived *env* sequences and analyzed by Western blotting using a pool of bNAbs against HIV-1 Env (10E8, 10-1074, N6, PG16, PGDM 1400, PGT 151, PGT 128, and 3BNC117). The actin control panel is shown below each Env panel. (B) Spearman correlation between overall Env expression (gp160+gp120), as measured by Western blot densitometry and the fusogenicity of the corresponding Envs.

de Verneuil et al.

Journal of Virology

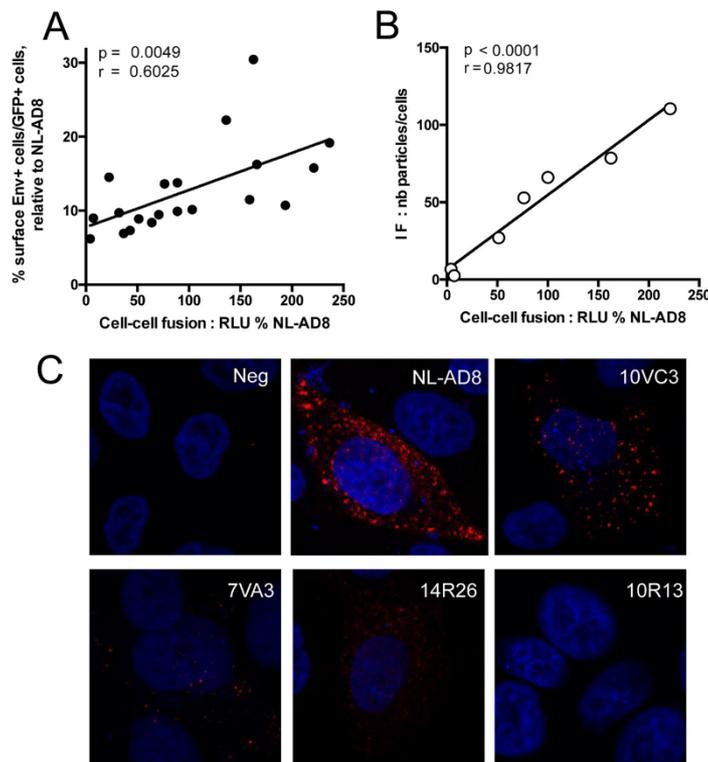


FIG 7 Cell surface expression of reservoir-derived Env sequences. (A) Pearson correlation between surface Env expression determined by flow cytometry and cell-cell fusion assay. (B) Pearson correlation between number of particles per cell determined by immunofluorescence (subject 7, VOAA3; subject 10, VOAC3 and RNA13; subject 14, RNA26; subject 19, VOA1 and RNA3) and cell-cell fusion assay. (C) Representative stack imaging by immunofluorescence for NL-AD8, subject 7 VOAA3, subject 14 RNA26, and subject 10 VOAC3, and RNA13. Reservoir-derived Env proteins are tagged using bNAbs pool (red); nuclei were stained with DAPI (blue).

expressing Env at their surfaces was counted as a proportion of cells expressing a cotransfected green fluorescent protein (GFP)-expressing control plasmid and then expressed as a percentage of the proportion of cells expressing NL-AD8 Env in the same experiment. As shown in Fig. 7A, a strong relation ($P = 0.0049$, $r = 0.6025$) was found between the proportion of cells expressing Env on their surfaces and the fusogenicity of the corresponding Env proteins. Of note, the proportion of primary Env-expressing cells was remarkably low (10- to 14-fold lower) than for cells expressing NL-AD8 Env. Overall, our flow cytometry findings are consistent with those made examining Western blots and strongly support the idea that fusogenicity and infectivity defects on the part of reservoir-derived Env proteins is essentially a function of the extent that Env proteins are stably expressed, matured, and exposed at the cell surface. There were, however, a few Env clones for which correlation between expression and fusion was rather loose. One such example is found with Env from subject 19, VOA 1, which was poorly fusogenic in spite of a satisfactory pattern of protein expression determined by Western blotting (Fig. 6A) and a rather high surface expression level (data not shown): in that particular case, we must assume that this Env glycoprotein was hampered in its function by structural changes that did not affect its production or stability. It is

February 2018 Volume 92 Issue 4 e01684-17

jvi.asm.org 8

 Downloaded from <http://jvi.asm.org/> on January 30, 2018 by INSERM

noteworthy that this particular Env protein was obtained from a VOA virus that readily emerged and replicated in culture.

We then examined cells transfected with different reservoir-derived *env* sequences by immunofluorescence microscopy (Fig. 7C). The transfected cells were fixed with paraformaldehyde (PFA) before staining, allowing specific analysis of surface expression of Env. We used the same human antibody pool as in the flow cytometry analyses described above. A variety of Env surface expression patterns was seen. In most cells expressing detectable Env, the signal was visible as multiple clusters of fluorescence, which varied in size and number. Control NL-AD8 Env expressed large clusters in high numbers. Clusters of comparable size but markedly lower numbers were seen with reservoir-derived Envs expressing high fusogenicity, such as VOAC3 from subject 10 and VOAA3 from subject 7. Env from subject 14 mRNA26 (14R26; Fig. 7C, middle lower panel), which expressed high fusogenicity, exhibited a unique pattern of multiple smaller clusters. Several reservoir-derived Envs were undetectable by immunofluorescence microscopy in spite of reproducibly detectable fusogenicity levels. Env expression was then quantified, using several fields and several Z-stacks for each transfected culture. As seen in Fig. 7B, we found a strong correlation between the number of surface Env clusters in these measurements and envelope fusogenicity ($P < 0.0001$, $r = 0.9817$), thereby reinforcing the results previously obtained by Western blotting and flow cytometry.

DISCUSSION

The near-constant resurgence of infectious HIV following interruption of ART in HIV-infected subjects is the main obstacle for an HIV cure. It is widely accepted that the rebounding virus originates from a stable reservoir of HIV proviruses integrated in resting memory T cells (3, 4, 6, 28). A very large proportion of the HIV T-cell reservoir, however, is constituted by nonreplicative viral genomes that carry a variety of deletions and of stretches of lethal G-to-A hypermutations (9, 10). Deletions are the consequence of the intrinsic instability of the retroviral reverse transcription process (29, 30), whereas hypermutations are caused by APOBEC3G, a single-stranded DNA editing enzyme that is normally, yet often imperfectly, counteracted by the HIV-encoded Vif protein (31, 32). Accumulation of defective genomes in the reservoir is perceptible early after a subject is infected (10), while in subjects treated at the chronic stage of their infection, grossly defective proviruses constitute the majority of the integrated HIV reservoir (9). The prevalence of these genetic defects is a strong indication that selection for defective HIV genomes is ongoing in the reservoirs of treated individuals. Defective genomes, indeed, are unable to produce functional HIV proteins: thus, they naturally escape HIV-mediated cytopathicity and evade immune clearance by cellular and/or soluble immune mechanisms. In this model, clearance of cells harboring intact and infectious virus would require the expression of HIV proteins, a situation that can only result from some level of cell activation, either through full stimulation by their cognate antigen or, probably more likely, through low-level activation as part of the natural homeostatic proliferation of memory T cells (8). Importantly, about half of the population of memory T cells harboring HIV sequences in an infected individual are part of readily measurable and often strikingly large clonal T-cell expansions (23, 24, 33). This feature of the reservoir could be related to some form of proliferation-inducing mechanism implying HIV provirus integration at sensitive sites of the T-cell genome or, in other instances, simply reflect the natural expansion of T cells clones through regular homeostatic proliferation.

In this context, the potential for the HIV T-cell reservoir to retain cells that are able to produce infectious virus over time could be explained by three different mechanisms that are not mutually exclusive. First, some reservoir cells could undergo homeostatic proliferation while keeping HIV protein expression repressed in the long term. Second, as recently proposed, constant proliferation of T cells that are part of some of large clonal expansions could compensate for the death of those cells within the clone that occasionally express HIV proteins (34). Third, a proportion of HIV proviruses in the T-cell

reservoir, improperly labeled as being “intact” could carry mutations affecting the extent to which viral proteins are stably expressed, making them less able to efficiently mediate viral cytopathicity or constitute targets for immune-mediated clearance. The data provided in our study essentially address this third mechanism.

Early studies on the nature of HIV genomes in the T-cell reservoir found a large gap between the number of apparently intact viral genomes in the reservoir and the amounts of infectious viruses that appear able to emerge from the reservoir following *in vitro* stimulation in qVOA. These studies found that apparently intact genomes that did not lead to emergence of propagative HIV in qVOA were nonetheless able to produce fully infectious virus when reconstructed and cloned (9). The reason why these genomes fail to emerge in qVOA has been proposed to be stochastic in nature (9). In our study, focusing on qVOA virus-derived and cell-associated mRNA-derived HIV *env* sequences from four subjects in whom HIV replication had been fully controlled for more than 4 years, we found that, in fact, a proportion of apparently intact *env* sequences code for Env proteins with notable functional defects. All sequences with nonsense codons, whether or not related to A-to-G APOBEC3G mutations, were excluded from the study. Interestingly, PCR analyses for cell-associated mRNAs revealed no internal *env* deletions (data not shown). This is consistent with the fact that expression of full *env* mRNA requires a number of *cis*- and *trans*-acting sequences within the *env* coding region. Moreover, because Env expression also requires a number of splicing signals outside the *env* coding region, it is likely that many of the mRNA-derived Env proteins studied here were actually derived from full-length HIV proviruses.

Env function was tested in a CD4- and CCR5-dependent quantitative cell-cell fusion assay and with a pseudotype infectivity assay. Further analyses of Env expression by flow cytometry, Western blotting, and immunofluorescence confocal microscopy indicated that the best correlates of poor Env-related fusogenicity and infectivity was low overall expression of Env and, more particularly, low surface expression of Env. This finding is consistent with the fact that among amino acid substitutions that could occur randomly within Env, only a small fraction would directly affect residues that are directly involved in receptor binding events or in conformational changes that lead to the fusion process itself. More likely are mutations that are potentially able to affect the translation, stability, transport, glycosylation, processing, and general conformation of Env, leading to proper expression of a fully functional Env trimer at the cell and, although this was not formally evaluated here, at the virion surface. Because the alignments did not suggest mutations known to be able to affect any of these processes, we have not, at this stage of our study, identified the precise mechanisms involved. One possible exception may be Env from VOA 1 in subject 19, a poorly fusogenic Env clone (yet from an infectious virus) in which surface expression was higher than most other Env clones from the same subject, suggesting a specifically functional rather than a general expression or maturation defect.

The extent of Env defects and the proportion of *env* clones exhibiting such defects strikingly differed according to the subject. One of them (subject 14), who had benefited from fully suppressive ART shortly after developing HIV infection, harbored qVOA- and mRNA-derived Env proteins with fully functional capacities. In contrast, in subject 19, who had been infected for more than 25 years and for whom ART was fully suppressive for the last 13 years, all but one Env clone (VOA 3) were less than half as fusogenic as control NL-AD8, and 60% of the clones expressed a fusogenicity level less than 25% of the control. In view of the fact that this study was limited to four subjects, however, we cannot draw firm conclusions as to whether the high prominence of defective *env* clones is actually a function of the time of evolution of the infection and/or of the treatment. Not unexpectedly, subject 19 had the most diverse population of *env* sequences, whether from VOA or from cell-associated mRNA.

The persistence in the reservoir of *env* sequences with low surface expression, resulting in low fusogenicity and infectivity, has several implications. First, cells expressing these *env* sequences are less likely to die from the cytopathic effect attributed to Env expression. This cytopathic effect can occur either as a result of fusion with

neighboring CD4- and CCR5-expressing cells or from Env expression on the part of single cells, following mechanisms that are not fully elucidated. Second, cells expressing low levels of Env glycoproteins will be less recognizable by specific antibodies, among which several have been described as strong effectors of ADCC in the presence of NK cells (16). In both cases, reduced Env expression would constitute an obstacle to attempts at reducing the size of the HIV T-cell reservoir *in vivo* through “shock and kill” approach (35–38), which would find particular resilience from viruses expressing Env with reduced cytopathicity or susceptibility to immune obliteration, such as those described in this study. Of note, immune clearance by cytotoxic T lymphocytes could also be impaired, under the necessary condition that the observed reduction in Env expression observed here be related to steps prior to or at very early stages of protein synthesis.

Our study has several limitations. First, the number of subjects included is small, which does not allow for generalization of our findings to all subjects under ART. In particular, our sample includes subjects presenting with different treatment histories and with quite distinct reservoir composition. Whether these distinctions can be generalized to particular groups of subjects should be the matter of further, less exploratory, large-scale studies. Nonetheless, our data strongly suggest that, depending on the subject, optimally fit viruses could be quite rare in the reservoir and should not be confused with viruses with an apparently intact sequence. Second, because treatment interruption was not allowed by the ethical review board, we could not include rebound viruses in our analyses, which instead focused on reservoir sequences as sampled by qVOA or cell-associated RNA. Our data, however, shed new light on the conditions that permit emergence of fully replicative virus from the reservoir after ART interruption. They suggest that rebound virus must emerge from a population of viruses that could be quite small, depending on the subject and on HIV infection history. They define a picture of the population of HIV genomes in the T-cell reservoir that contrasts with the vision of that reservoir as composed of a majority of grossly defective genomes and a minority of fully functional infectious proviruses. In line with what is seen in most biological selection processes, HIV reservoir genomes that survive immune or cytopathic selection appear to include a population of viruses with a wide range of functional or protein expression defects. Within that range, some viruses may be prone to corrective changes, which, after ART interruption, would restore their replicative and propagative potential. One interesting possibility, among others, is that infectious viruses that emerge from the reservoir could have been subjected to rapid corrective adaptation through recombination, a highly efficient mechanism for reconstruction of viral genomes from parental viruses carrying a number of replicative defects, provided that the recombination partners are able to phenotypically complement each other, can be coexpressed in the same cell, and be further encapsidated in the same virion. In such a scenario, viruses with low infectivity, such as those described here, could be readily rescued by recombination among other corrective mechanisms and become able to contribute to HIV rebound after ART withdrawal.

MATERIALS AND METHODS

Quantitative virus outgrowth assays (qVOA). From 40 ml of blood for each subject, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by a Ficoll gradient (Histopaque; Sigma-Aldrich). Resting CD4⁺ T lymphocytes were isolated using a purification CD4 resting custom kit (CD4-negative selection, CD25⁻ CD69⁻ HLA-DR⁻ cells; Stem Cell). A total of 2.10⁵ CD4⁺ resting cells were seeded per well in 24-well plates and activated using CD3/CD28 beads (ratio 1:2) using Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Invitrogen) for T cell expansion and activation for 24 h. CD4⁺ T lymphocytes from uninfected donors were isolated (CD4⁺ T-cell enrichment kit; Stem Cell) and activated with phytohemagglutinin (Thermo Scientific) at 1 μg/ml during 3 days and cultured 1 day in RPMI+IL-2 (100 U/ml; recombinant human interleukin 2 [rh-IL-2]; Immuno Tools GmbH). A total of 10⁵ of these cells were then cocultured with the subject's activated rCD4⁺ T cells. At the end of each week, HIV outgrowth was detected using a p24 enzyme-linked immunosorbent assay (Innotest HIV antigen MAb; Fujirebio; Ingen). For positive samples, the supernatant and half of the cells were frozen at -80°C (Fig. 1).

PCR amplification of HIV-1 env. The HIV-1 *env* genes studied here were obtained from two sources: DNA from cells in positive qVOA wells, and cell-associated RNA from a fraction of the subject's resting CD4⁺ T cells after CD3-CD28 stimulation (Fig. 1).

DNA extraction from p24-positive qVOA cultures was performed on 10^6 total cells by using a QIAamp blood minikit (Qiagen). Since the rate of positive wells in the qVOA cultures was generally between 1/3 and 1/24, viruses from these cultures were considered clonal, which did not require that limiting-dilution PCR be further performed. The HIV-1 *env* gene was amplified by a nested PCR using Phusion Hot Start II DNA polymerase kit (Thermo Fisher) with 10 ng of DNA in HF buffer, 2 mM concentrations (each) of deoxynucleoside triphosphates (dNTP), 0.2 μ M forward and reverse primers, 3% dimethyl sulfoxide (DMSO), 0.5 U of Phusion polymerase, and H_2O in a total 50- μ l reaction volume. The primers were as follows: forward outside (5'-ATGGCAGGAAGAAAGCGGAGACAG-3') and reverse outside (5'-TGTGTAGTTC TGCCAATCAGGGAAAGTAGCCTTG-3'). The outside cycling conditions were 98°C for 30 s, followed by 36 cycles of 98°C for 30 s, 68°C for 15 s, and 72°C for 1 min 30 s, with a final extension at 72°C for 10 min. WQe then used the following primers: forward inside (5'-TGGATAGTCTAGAAGAAAGAGCAGAAGACAGT GGCAATG-3') and reverse inside (5'-CCTTGTCCGGGACGCGCTCTAAAGGTACCTGAGGTGTGACTGG-3'). The inside cycling conditions were 98°C for 30 s, followed by 36 cycles of 98°C for 30 s, 68.5°C for 15 s, and 72°C for 1 min 30 s, with a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were gel purified with a NucleoSpin gel and PCR Clean-Up kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol.

Cell-associated mRNA extraction from each subject's CD4⁺ T cells was performed on 10^6 cells, 2 days after rCD4⁺ T cells had been activated by CD3/CD28 beads (Fig. 1). Reverse transcription was performed on 500 ng of RNA extract in a 10- μ l volume with a SuperScript III First-Strand Synthesis system kit (Thermo Fisher). The *env* coding region was then amplified by a limiting-dilution nested PCR using a Phusion Hot Start II DNA polymerase kit (Thermo Fisher). Limiting-dilution PCR was performed using undiluted reverse transcriptase and serial dilutions at 1/3, 1/9, 1/27, and 1/81 in HF buffer, 2 mM concentrations of each dNTP, 0.2 μ M concentrations of forward and reverse primers, 3% DMSO, 0.5 U of Phusion polymerase, and 1 μ l of cDNA in a total volume of 50 μ l. PCR conditions were the same as described above. PCR products were gel purified using a NucleoSpin gel and PCR Clean-Up kit according to the manufacturer's protocol.

Cloning of HIV-1 *env*. Amplification products from qVOA and from the last positive limiting-dilution reactions from cell-associated RNA were cloned in the TOPO cloning system. For TA tailing, 0.8 μ M dATP were added, followed by 0.25 μ l of recombinant polymerase (Thermo Fisher) with 0.4 μ M $MgCl_2$ and 0.5 μ l of KCl buffer for 30 min at 72°C. Topo cloning was performed with 2 μ l of TA tailing reaction using a Topo XL vector kit (Thermo Fisher) according to the manufacturer's protocol. To ensure that Topo clones were not carrying PCR-related mutations, all clones from each PCR were sequenced, aligned, and compared. Only clones representing a consensus sequence for the same PCR were retained, and clones carrying mutations that were not present in other clones from the same PCR were excluded. Inserts were then cloned in the Rev-independent pCGCG expression plasmid (39).

Culture conditions. HeLa 273Tat cells (provided by Olivier Schwartz) were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM), 10% fetal calf serum (FCS), penicillin-streptomycin (10 ng/ml; Thermo Fisher), and methotrexate (MTX) at 1 mM. HeLa TZM.BL and HEK 293T cells (both from the NIH AIDS reagent repository) were cultured in DMEM-10% FCS and penicillin-streptomycin at 10 ng/ml. PBMCs and rCD4⁺ T cells were cultured in RPMI-10% FCS and penicillin-streptomycin at 10 ng/ml.

Cell-cell fusion assay. The cell-cell fusion assay used in this study is derived from that of Labrosse et al. (26). Briefly, HeLa 273 Tat cells, which constitutively express the HIV Tat protein, were transfected with 500 ng of pCGCG Env with the DNA transfection reagent jetPEI (Polyplus; Ozyme) in 24-well plates. After 24 h, 7×10^5 of the transfected HeLa 273 Tat cells were cocultivated with 7×10^5 TZM.BL cells in triplicate in 96-well plates. The β -galactosidase activity, resulting from activation of the Tat-dependent beta-Gal gene in TZM.BL cells was revealed with a beta-Gal reporter gene chemiluminescence assay (Roche). The total protein content in each reaction mixture was quantified by using a Bradford test (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol.

Pseudotype infectivity assay. 293T cells were seeded in 6-well plates in DMEM at 8.5×10^4 cells/well and were transfected 3 days later with 1.5 μ g of pNL4-3 delta Env-luciferase renilla and 2 μ g of pCGCG-Env with calcium phosphate. At 16 h posttransfection, the medium was replaced, and the supernatant was harvested at 48 h posttransfection. The HIV p24 concentration was measured by an ELISA Lenti-X p24 rapid titer kit (Clontech; Ozyme). TZM.BL cells were seeded in 96-well plates at 10,000 cells/well and infected with serial dilutions of supernatant containing 6.25, 12.5, 25, or 50 ng of HIV-1 p24 in triplicate wells. Two days later, the β -galactosidase activity was revealed with a beta-Gal reporter gene chemiluminescence assay (Roche).

Flow cytometry. HeLa 273 Tat were cotransfected with 2 μ g of pCGCG Env and 2 μ g of pPGK internal ribosome entry site (IRES) GFP with the DNA transfection reagent jetPEI. After 2 days in culture, the cells were collected with 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS)-EDTA at 0.5 mM (5 min, 37°C) and washed with PBS containing 10% of FCS (400 \times g; 4 min). A total of 2×10^5 cells were resuspended in 100 μ l of PBS-10% FCS for 1 h at 37°C. The cells were then incubated with a mixture of primary human anti-Env broadly neutralizing antibodies (bNAbs): 10E8, 10-1074, N6, PG16, PGDM 1400, PGT 151, PGT 128, and 3BNC117 [provided by Hugo Mouquet, Institut Pasteur, Paris, France] at 150 μ g/ml for 30 min at 37°C. After three washes in PBS-10% FCS, the cells were incubated with secondary goat anti-human antibodies conjugated with Alexa Fluor 647 diluted at 1/2,000 (Thermo Fisher) for 25 min at 4°C. After two washes in PBS-10% FCS and one wash in PBS, the cells were fixed with 1% paraformaldehyde.

Western blots. HeLa 273 Tat cells were cotransfected with 2 μ g of pCGCG Env and 2 μ g of pCGGK IRES GFP with DNA transfection reagent jetPEI. Two days later, 10^6 cells were lysed in 1 \times radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer. After a Bradford test (Bio-Rad), 20 μ g of total protein was resuspended in 1 \times Laemmli buffer and heated for 5 min at 99°C. Electrophoretic migration was performed in a NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris gel (1.0 mm, 10 wells) with 1 \times NuPAGE MOPS SDS running buffer

(Thermo Fisher) at 160 V for 1 h. Proteins were transferred to a 0.45- μ m-pore size Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Millipore) at 400 mA for 1 h and 30 min. The membrane was saturated with PBS containing 5% of nonfat milk and then incubated with primary anti-Env bNAbs (see above) at 4 μ g/ml for 18 h at 4°C. After three washes with 1 \times PBS–0.5% Tween 20, the membrane was incubated with a goat anti-human IgG Fc cross-adsorbed secondary antibody HRP (Invitrogen) diluted at 1/5,000 in PBS containing 5% nonfat milk for 1 h at room temperature. After three washes with 1 \times PBS–0.5% Tween 20, Env proteins were revealed with Immobilon Western substrate for HRP enzyme (Millipore). For actin controls, the membrane was incubated with primary antibody, mouse monoclonal anti-alpha-beta-actin (Sigma, catalog no. A1978), diluted at 1/5,000 in PBS containing 5% nonfat milk, for 1 h at room temperature. After three washes, the membranes were incubated with secondary antibodies anti-mouse HRP diluted at 1/5,000 in PBS containing 5% nonfat milk for 1 h at room temperature. After three washes, actin was revealed as described above.

Immunofluorescence microscopy. HeLa 273 Tat were transfected with 2 μ g of pCGCG Env using the DNA transfection reagent jetPEI. One day later, the cells were harvested in PBS–0.5 mM EDTA, and 10⁵ cells were cultured on 14-mm² slides in culture medium. The cells were then incubated with bNAbs at 10 μ M for 1 h at 37°C diluted in DMEM–10% FCS. After three washes with DMEM–10% FCS, the cells were incubated with anti-human antibodies conjugated with Alexa Fluor 647 (1/2,000) for 1 h at 4°C. After two washes with DMEM–10% SVF and one wash with PBS, the cells were then fixed in 4% PFA. After two washes with PBS, the cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 10 min at room temperature, washed twice in PBS, incubated with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen), diluted at 1/10,000 for 5s, washed again twice in PBS, and then dried and mounted with Prolong Gold reagent (Thermo Fisher). Slides were observed with a LSM 800 microscope (Zeiss). A total of five fields containing 15 to 20 cells each were acquired with 12 to 18 Z-stacks to cover all cell heights. Quantification was performed using ImageJ software. A Z-projection was performed on each field, the cells were counted, and a binary transformation was performed on the Alexa Fluor 647 channel. Red fluorescent particles were quantified and measured using the "Analyze Particles" plugin.

Statistical analyses. Statistical comparison of sets of values was performed using a Mann-Whitney test. For correlation analyses between selected variables, a two-tailed Pearson and Spearman test was performed using Prism GraphPad 6.0 software.

Phylogenetic analyses. HIV-1 env nucleotide sequences were aligned using ClustalW (40); phylogenetic trees were generated by maximum likelihood using FastTree (41) and the Newick display (42). Analyses were performed through the Mobyle and Galaxy online platforms (Institut Pasteur, Paris, France [<https://galaxy.pasteur.fr>]). Coreceptor tropism was analyzed using the G2P algorithm (25).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the participants in the study. We thank the staff of the technical platform at IUH, Hôpital Saint Louis, Paris, for their expert assistance. We are indebted to Valérie Lorin, département d'Immunologie, Institut Pasteur, Paris, France, for the selection, preparation, and purification of human bNAbs.

This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), by the Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites Virales (ANRS), and by the Université Paris Diderot.

REFERENCES

- Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, Richman DD, Valentine FT, Jonas L, Meibohm A, Emini EA, Chodakewitz JA. 1997. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 337:734–739. <https://doi.org/10.1056/NEJM199709113371102>.
- Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJ, Feinberg JE, Balfour HH, Deyton LR, Chodakewitz JA, Fischl MA. 1997. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 337:725–733.
- Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siliciano RF. 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in subjects on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278:1295–1300. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1295>.
- Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD. 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278:1291–1295. <https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1291>.
- Wong JK, Günthard HF, Havlir DV, Zhang ZQ, Haase AT, Ignacio CC, Kwok S, Emini E, Richman DD. 1997. Reduction of HIV-1 in blood and lymph nodes following potent antiretroviral therapy and the virologic correlates of treatment failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12574–12579. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12574>.
- Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. 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* 95:8869–8873. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8869>.
- Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisiewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF. 1999. Latent infection of CD4⁺ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in subjects on effective combination therapy. *Nat Med* 5:512–517. <https://doi.org/10.1038/8394>.
- Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel M-R, Ghattas G, Brechley JM, Schacker TW, Hill BJ, Douek DC, Routy J-P, Haddad EK, Sékaly R-P. 2009. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 15:893–900. <https://doi.org/10.1038/nm.1972>.
- Ho Y-C, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DIS, Lai J, Blankson JN, Siliciano JD, Siliciano RF. 2013. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 155:540–551. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.020>.
- Bruner KM, Murray AJ, Pollack RA, Soliman MG, Laskey SB, Capoferri AA,

- Lai J, Strain MC, Lada SM, Hoh R, Ho Y-C, Richman DD, Deeks SG, Siliciano JD, Siliciano RF. 2016. Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med* 22:1043–1049. <https://doi.org/10.1038/nm.4156>.
11. Laird GM, Eisele EE, Rabi SA, Lai J, Chioma S, Blankson JN, Siliciano JD, Siliciano RF. 2013. Rapid quantification of the latent reservoir for HIV-1 using a viral outgrowth assay. *PLoS Pathog* 9:e1003398. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003398>.
 12. Jordan A, Bisgrove D, Verdin E. 2003. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J* 22:1868–1877. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg188>.
 13. Jordan A, Defechereux P, Verdin E. 2001. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J* 20:1726–1738. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1726>.
 14. Sherrill-Mix S, Lewinski MK, Famiglietti M, Bosque A, Malani N, Ocwieja KE, Berry CC, Looney D, Shan L, Agosto LM, Pace MJ, Siliciano RF, O'Doherty U, Guatelli J, Planelles V, Bushman FD. 2013. HIV latency and integration site placement in five cell-based models. *Retrovirology* 10:90. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-90>.
 15. Stamatatos L, Morris L, Burton DR, Mascola JR. 2009. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med* 15:866–870. <https://doi.org/10.1038/nm.1949>.
 16. Bruel T, Guivel-Benhassine F, Amraoui S, Malbec M, Richard L, Bourdic K, Donahue DA, Lorin V, Casartelli N, Noël N, Lambotte O, Mouquet H, Schwartz O. 2016. Elimination of HIV-1-infected cells by broadly neutralizing antibodies. *Nat Commun* 7:10844. <https://doi.org/10.1038/ncomms10844>.
 17. Mujib S, Liu J, Rahman AKMN, Schwartz JA, Bonner P, Yue FY, Ostrowski MA. 2017. Comprehensive cross-clade characterization of antibody-mediated recognition, complement-mediated lysis and cell-mediated cytotoxicity of HIV-1 envelope specific antibodies towards the eradication of the HIV-1 reservoir. *J Virol* 91:e00634-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00634-17>.
 18. Koenig S, Earl P, Powell D, Pantaleo G, Merli S, Moss B, Fauci AS. 1988. Group-specific, major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic responses to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope proteins by cloned peripheral blood T cells from an HIV-1-infected individual. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8638–8642. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.22.8638>.
 19. Sodroski J, Haseltine W, Kowalski M. 1991. Role of the human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein in cytopathic effect. *Adv Exp Med Biol* 300:193–201. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5976-0_12.
 20. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Campbell K, Haseltine WA. 1986. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 322:470–474. <https://doi.org/10.1038/322470a0>.
 21. LaBonte JA, Patel T, Hofmann W, Sodroski J. 2000. Importance of membrane fusion mediated by human immunodeficiency virus envelope glycoproteins for lysis of primary CD4-positive T cells. *J Virol* 74:10690–10698. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.22.10690-10698.2000>.
 22. Kim M, Siliciano RF. 2016. Reservoir expansion by T-cell proliferation may be another barrier to curing HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:1692–1694. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600097113>.
 23. Maldarelli F, Wu X, Su L, Simonetti FR, Shao W, Hill S, Spindler J, Ferris AL, Mellors JW, Kearney MF, Coffin JM, Hughes SH. 2014. HIV latency: specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* 345:179–183. <https://doi.org/10.1126/science.1254194>.
 24. Wagner TA, McLaughlin S, Garg K, Cheung CYK, Larsen BB, Styrchak S, Huang HC, Edlefsen PT, Mullins JI, Frenkel LM. 2014. HIV latency: proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science* 345:570–573. <https://doi.org/10.1126/science.1256304>.
 25. Beerenwinkel N, Däumer M, Oette M, Korn K, Hoffmann D, Kaiser R, Lengauer T, Selbig J, Walter H. 2003. Geno2pheno: estimating phenotypic drug resistance from HIV-1 genotypes. *Nucleic Acids Res* 31:3850–3855. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg575>.
 26. Labrosse B, Treboute C, Alizon M. 2000. Sensitivity to a nonpeptidic compound (RPR103611) blocking human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated fusion depends on sequence and accessibility of the gp41 loop region. *J Virol* 74:2142–2150. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.5.2142-2150.2000>.
 27. Mouquet H, Klein F, Scheid JF, Warncke M, Pietzsch J, Oliveira TYK, Velinzon K, Seaman MS, Nussenzweig MC. 2011. Memory B cell antibodies to HIV-1 gp140 cloned from individuals infected with clade A and B viruses. *PLoS One* 6:e24078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024078>.
 28. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, Siliciano RF. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387:183–188. <https://doi.org/10.1038/387183a0>.
 29. Pulsinelli GA, Temin HM. 1991. Characterization of large deletions occurring during a single round of retrovirus vector replication: novel deletion mechanism involving errors in strand transfer. *J Virol* 65:4786–4797.
 30. Pulsinelli GA, Temin HM. 1994. High rate of mismatch extension during reverse transcription in a single round of retrovirus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9490–9494. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.20.9490>.
 31. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, Neuberger MS, Malim MH. 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113:803–809. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00423-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00423-9).
 32. Lécossier D, Bouchonnet F, clavel F, Hance AJ. 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* 300:1112–1112. <https://doi.org/10.1126/science.1083338>.
 33. Lorenzi JCC, Cohen YZ, Cohn LB, Kreider EF, Barton JP, Learn GH, Oliveira T, Lavine CL, Horwitz JA, Settler A, Jankovic M, Seaman MS, Chakraborty AK, Hahn BH, Caskey M, Nussenzweig MC. 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:E7908–E7916. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617789113>.
 34. Wiegand A, Spindler J, Hong FF, Shao W, Cyktor JC, Gillo AR, Halvas EK, Coffin JM, Mellors JW, Kearney MF. 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:E3659–E3668. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617961114>.
 35. Deeks SG. 2012. HIV: shock and kill. *Nature* 487:439–440. <https://doi.org/10.1038/487439a>.
 36. Bruner KM, Hosmane NN, Siliciano RF. 2015. Towards an HIV-1 cure: measuring the latent reservoir. *Trends Microbiol* 23:192–203. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.013>.
 37. Margolis DM. 2017. Towards an HIV cure: a view of a developing field. *J Infect Dis* 215:S109–S110. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw633>.
 38. Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, Jennings C, Spina CA, Wiegand A, Landay AL, Coombs RW, Richman DD, Mellors JW, Coffin JM, Bosch RJ, Margolis DM. 2005. Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet* 366:549–555. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67098-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67098-5).
 39. Serra-Moreno R, Zimmermann K, Stern LJ, Evans DT. 2013. Tetherin/BST-2 antagonism by Nef depends on a direct physical interaction between Nef and tetherin, and on clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Pathog* 9:e1003487. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003487>.
 40. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
 41. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2009. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol* 26:1641–1650. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp077>.
 42. Dress AWM, Flamm C, Fritzsche G, Grünwald S, Kruspe M, Prohaska SJ, Stadler PF. 2008. Noisy: identification of problematic columns in multiple sequence alignments. *Algorithms Mol Biol* 3:7. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-3-7>.