



**HAL**  
open science

# Interactions du VIH-1 avec ses cellules cibles : recherche de nouveaux réservoirs et analyse du contrôle de la latence

Sandie Munier

## ► To cite this version:

Sandie Munier. Interactions du VIH-1 avec ses cellules cibles : recherche de nouveaux réservoirs et analyse du contrôle de la latence. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2005. Français. NNT: . tel-00263880

**HAL Id: tel-00263880**

**<https://theses.hal.science/tel-00263880>**

Submitted on 13 Mar 2008

**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.

Université Paris 7 Denis Diderot  
UFR de Biochimie  
Ecole Doctorale B2M  
2 place Jussieu  
75005 Paris

Institut Cochin, INSERM U567, CNRS UMR8104  
Département Maladies Infectieuses  
Equipe Interactions virus-cellule hôte  
22 rue Méchain  
75014 Paris

## **THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 7 DENIS DIDEROT**

Année 2005

Spécialité

**Microbiologie option Virologie**

Présentée par

**M<sup>elle</sup> Sandie MUNIER**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS 7 DENIS DIDEROT**

### **INTERACTIONS DU VIH-1 AVEC SES CELLULES CIBLES : RECHERCHE DE NOUVEAUX RESERVOIRS ET ANALYSE DU CONTROLE DE LA LATENCE**

Soutenue le 26 Septembre 2005

Devant le jury composé de :

M<sup>me</sup> le Professeur Sylvie VAN DER WERF

M. le Docteur Monsef BENKIRANE

M. le Docteur Jean-François MOUSCADET

M. le Docteur Olivier SCHWARTZ

M. le Professeur Uriel HAZAN

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

*A Gérard*

*A mes parents*

## *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Sylvie van der Werf d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.*

*Je remercie très sincèrement les Docteurs Jean-François Mouscadet et Monsef Benkirane d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs et Olivier Schwartz en tant qu'examineur.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Uriel Hazan pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées tout au long de ma thèse.*

*Je remercie très chaleureusement toutes les personnes qui ont constitué l'équipe Hazan pendant ces 4 années : Delphine, Morgane, Céline, Lan, Alejandra, Virginie, Marilyne, Carole, Mathieu, Aurélia, Karine, Audrey, Fanny, Cécile et Véronique. Merci pour votre aide, votre soutien, et votre bonne humeur. Un grand merci à Delphine avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et à ses doigts de fée pour toutes les manips réussies... Merci pour tout.*

*Merci également à tous ceux de l'Institut Cochin qui m'ont aidée et conseillée. En particulier, merci à Benoît pour son amitié et les moments passés dans le P2, à Audrey pour ses précieux conseils et son soutien et à mes coloc de P3 : Nicolas, Mélanie et Marie-Pierre pour leur bonne humeur. Merci aussi aux Séquenceurs, à Dominique pour la biblio, Claudine, Anne-Marie, Murielle et à mon « parrain » Gilles. Je remercie très sincèrement Jean-Pierre pour sa gentillesse, sa disponibilité et tous les conseils qu'il a pu me donner.*

*Enfin, je remercie tendrement mes parents, ma famille, ma « jumelle » et mes amis pour leur présence et leurs encouragements tout au long de ma thèse. Merci à Gérard de m'avoir soutenue (supportée ?) à tous les moments. Merci d'être là.*

## ***RESUME***

L'existence de réservoirs cellulaires du VIH-1 constitue un obstacle majeur à l'éradication de l'infection. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents constituent le réservoir majeur de latence chez les patients infectés sous trithérapie. Cependant, l'ampleur des réactivations virales observées lors des interruptions de traitement suggère que le VIH-1 persiste dans des réservoirs viraux encore non caractérisés. L'identification de ces réservoirs ainsi que la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien et la réactivation de la latence sont essentiels afin d'élaborer une stratégie efficace pour éliminer le virus des réservoirs cellulaires. Mon travail de thèse a porté d'une part, sur l'étude de l'infection du tissu adipeux par le VIH-1 et son rôle potentiel comme nouveau tissu cible, et d'autre part, sur la recherche de gènes cellulaires candidats impliqués dans le contrôle de la latence du VIH-1.

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si la faible production virale obtenue après infection de préadipocytes par le VIH-1 est due à une faible efficacité d'infection (expression des récepteurs) ou à une faible efficacité de réplication (blocage pré- ou post-intégration). Nous avons infecté des préadipocytes humains primaires par des virus pseudotypés avec des glycoprotéines d'enveloppe de différents tropismes. Aucun blocage de l'entrée ni de la réplication n'est observé avec les virus portant une enveloppe ubiquitaire alors que les virus de tropismes X4 et R5 ne sont pas capables d'infecter ces cellules. En revanche, si les récepteurs sont apportés en *trans*, l'infection des préadipocytes par les virus de tropismes X4 et R5 est restaurée. La co-expression insuffisante des récepteurs viraux à la surface de ces cellules suggère que le tissu adipeux n'est pas une cible privilégiée pour le virus *in vivo* et ne peut donc être considéré comme un nouveau réservoir pour le virus VIH-1.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé le transcriptome différentiel de lignées cellulaires infectées de façon latente par le VIH-1 et stimulées ou non pour la réactivation de la latence par un inhibiteur d'histone déacétylase. Parmi les gènes caractérisés, deux nous ont paru particulièrement intéressants : *NCoA3*, dont l'expression est augmentée, et *IRF8*, dont l'expression est diminuée, après stimulation des cellules infectées de façon latente. Après avoir confirmé les modifications de l'expression de ces gènes au niveau transcriptionnel et traductionnel, nous avons analysé leurs rôles fonctionnels sur la transcription du VIH-1. Notamment, le facteur NCoA3 augmente l'activation de la transcription virale par Tat et le facteur IRF8 inhibe l'activation de la transcription virale par IRF1. Les facteurs NCoA3 et IRF8 pourraient respectivement être impliqués dans la réactivation et le maintien de la latence virale et fournir de nouvelles cibles pour contrôler la réplication virale dans les réservoirs cellulaires *in vivo*.

# TABLE DES MATIERES

RESUME .....	1
TABLE DES MATIERES .....	2
ABREVIATIONS.....	6
INTRODUCTION.....	7
<b>1. LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH-1) .....</b>	<b>7</b>
1.1. SIDA et VIH-1 .....	7
1.2. Epidémiologie liée au VIH-1 .....	7
1.3. Physiopathologie de l'infection par le VIH-1.....	8
1.3.1. <i>Primo-infection</i> .....	8
1.3.2. <i>Phase asymptomatique ou phase de latence clinique</i> .....	8
1.3.3. <i>Phase SIDA</i> .....	9
1.4. Tropisme du VIH-1 .....	9
1.5. Particule virale .....	10
1.6. Génome du VIH-1 .....	11
1.6.1. <i>Protéines de structure</i> .....	11
1.6.2. <i>Protéines régulatrices</i> .....	12
1.6.3. <i>Protéines auxiliaires</i> .....	12
1.7. Cycle viral .....	13
1.7.1. <i>Etapas précoces</i> .....	13
1.7.2. <i>Etapas tardives</i> .....	13
1.8. Traitements antirétroviraux .....	14
1.8.1. <i>Cibles des traitements antirétroviraux</i> .....	14
1.8.2. <i>Effets des thérapies antirétrovirales sur la réplication du VIH-1 et le risque de progression vers le SIDA</i> .....	14
<b>2. RESERVOIRS DE LATENCE ET DE PERSISTANCE DU VIH-1 .....</b>	<b>16</b>
2.1. Dynamique de l'infection virale <i>in vivo</i> .....	16
2.1.1. <i>Première phase de déclin</i> .....	16
2.1.2. <i>Deuxième phase de déclin</i> .....	17
2.1.3. <i>Hypothèse de l'éradication</i> .....	18
2.2. Réservoir de latence : lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> quiescents mémoires .....	18
2.2.1. <i>Bases physiologiques de l'infection latente des lymphocytes T CD4<sup>+</sup></i> .....	18
2.2.2. <i>Latence pré-intégrative dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents</i> .....	19
2.2.3. <i>Latence post-intégrative</i> .....	20
2.2.4. <i>Effet des thérapies antirétrovirales sur le réservoir de latence</i> .....	21
2.2.5. <i>Origine de la stabilité du réservoir de latence</i> .....	23
2.2.6. <i>Approches pour éliminer le réservoir de latence</i> .....	25
2.3. Autres réservoirs viraux .....	26

2.3.1.	Cellules T CD8 <sup>+</sup> .....	27
2.3.2.	Cellules B.....	27
2.3.3.	Cellules NK.....	27
2.3.4.	Monocytes / Macrophages.....	28
2.3.5.	Cellules dendritiques.....	28
<b>3.</b>	<b>INTERACTIONS ENTRE LE VIH-1 ET LA CELLULE HOTE.....</b>	<b>29</b>
3.1.	Entrée virale .....	29
3.1.1.	Déterminants cellulaires et viraux de l'entrée virale.....	30
3.1.2.	Mécanisme d'entrée du VIH-1.....	31
3.2.	Transcription inverse.....	32
3.2.1.	Complexe de transcription inverse ou RTC.....	32
3.2.2.	Rôle de la protéine virale Vif dans la transcription inverse.....	33
3.2.3.	Rôle de la protéine cellulaire cyclophiline A dans les étapes précoces.....	33
3.3.	Import nucléaire du complexe de pré-intégration.....	34
3.4.	Intégration.....	36
3.5.	Transcription du génome viral.....	37
3.6.	Export des ARNm viraux vers le cytoplasme et synthèse des protéines virales.....	38
3.7.	Modifications de l'environnement de la cellule infectée.....	39
3.8.	Assemblage des particules virales.....	40
3.8.1.	Rôles du précurseur Gag pr55 dans l'assemblage.....	40
3.8.2.	Biosynthèse, maturation, transport et incorporation des glycoprotéines d'enveloppe gp160.....	40
3.8.3.	Incorporation des protéines virales et cellulaires.....	41
3.9.	Bourgeonnement et maturation des particules virales.....	41
3.9.1.	Bourgeonnement des particules virales.....	41
3.9.2.	Maturation des particules virales.....	42
<b>4.</b>	<b>REGULATION DE LA TRANSCRIPTION DU VIH-1.....</b>	<b>43</b>
4.1.	Eléments de régulation de la transcription présents en cis sur le promoteur viral.....	43
4.1.1.	Promoteur basal.....	43
4.1.2.	Région « enhancer ».....	44
4.1.3.	Région régulatrice en amont du site d'initiation de la transcription.....	45
4.1.4.	Région régulatrice en aval du site d'initiation de la transcription.....	46
4.1.5.	Élément de réponse à la transactivation TAR.....	47
4.2.	Rôle de la chromatine dans la régulation transcriptionnelle du VIH-1.....	48
4.2.1.	Rôle de la chromatine dans la régulation transcriptionnelle.....	48
4.2.2.	Structure chromatinienne du promoteur viral.....	50
4.2.3.	Remodelage de la chromatine et régulation de la transcription du VIH-1.....	51
4.2.4.	Recrutement des complexes de remodelage de la chromatine par les facteurs de transcription au niveau du LTR.....	54
4.2.5.	Influence du site d'intégration de l'ADN proviral sur la transcription.....	57
4.3.	Régulation de la transcription par la protéine Tat.....	59
4.3.1.	Structure de la protéine Tat.....	59
4.3.2.	Interaction de la protéine Tat avec l'ARN viral TAR.....	59
4.3.3.	Interaction de la protéine Tat avec le complexe P-TEFb.....	60

4.3.4.	<i>Interaction de la protéine Tat avec des protéines acétyltransférases</i> .....	61
4.3.5.	<i>Acétylation de la protéine Tat</i> .....	62
<b>5.</b>	<b>MECANISMES MOLECULAIRES DE LA LATENCE POST-INTEGRATIVE</b> .....	<b>63</b>
5.1.	Initiation absente ou inefficace de la transcription du génome viral .....	64
5.1.1.	<i>Inaccessibilité du provirus intégré à la machinerie de transcription cellulaire</i> .....	64
5.1.2.	<i>Absence de formes actives des facteurs de transcription nécessaires à l'expression des gènes viraux</i> ....	65
5.1.3.	<i>Présence de facteurs de transcription répresseurs</i> .....	66
5.2.	Elongation inefficace de la transcription du génome viral .....	66
5.3.	Export inefficace des transcrits viraux codant les protéines virales tardives.....	67
<b>6.</b>	<b>OBJECTIFS DE MON TRAVAIL DE THESE</b> .....	<b>68</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....		<b>69</b>
<b>1.</b>	<b>MATERIELS</b> .....	<b>69</b>
<b>2.</b>	<b>METHODES CELLULAIRES</b> .....	<b>73</b>
<b>3.</b>	<b>METHODES MOLECULAIRES</b> .....	<b>77</b>
<b>RESULTATS</b> .....		<b>83</b>
<b>1.</b>	<b>INFECTION DU TISSU ADIPEUX HUMAIN PAR LE VIH-1 : UN NOUVEAU TISSU CIBLE ?</b> .....	<b>83</b>
1.1.	Introduction .....	83
1.1.1.	<i>Tissu adipeux</i> .....	83
1.1.2.	<i>Travaux antérieurs</i> .....	84
1.1.3.	<i>Objectifs</i> .....	84
1.2.	Expression du plasmide pLTR-luc dans des préadipocytes .....	85
1.3.	Expression de l'ADN proviral pNL4.3Δenv-luc dans des préadipocytes .....	85
1.4.	Infection de préadipocytes et d'adipocytes par des virus pseudotypés .....	87
1.5.	Analyse de l'expression des récepteurs CD4, CXCR4 et CCR5 .....	89
1.6.	Infection de préadipocytes transfectés avec les récepteurs du VIH-1 par des virus pseudotypés .	90
1.7.	Infection de préadipocytes transfectés avec les récepteurs du VIH-1 par des virus adaptés et primaires.....	92
1.8.	Conclusion.....	93
<b>2.</b>	<b>RECHERCHE DE GENES CELLULAIRES CANDIDATS IMPLIQUES DANS LE CONTROLE DE LA LATENCE DU VIH-1</b> .....	<b>94</b>
2.1.	Introduction .....	94
2.1.1.	<i>Incidence de l'infection du VIH-1 sur la transcription cellulaire</i> .....	94
2.1.2.	<i>Objectifs</i> .....	95
2.2.	Analyse du transcriptome différentiel de lignées cellulaires infectées par le VIH-1 par micropuces à haute densité .....	95
2.3.	Analyse de l'implication du gène <i>NCoA3</i> dans la réactivation de la latence du VIH-1 .....	98
2.3.1.	<i>NCoA3 : Nuclear Receptor Coactivator 3</i> .....	98
2.3.2.	<i>Modification de l'expression du gène NCoA3 dans les cellules infectées de façon latente et stimulées par le NaB</i> .....	100
2.3.3.	<i>Transactivation du LTR par Tat et NCoA3</i> .....	102

2.3.4.	<i>Etude des partenaires de NCoA3 sur le promoteur viral</i> .....	103
2.3.5.	<i>Réactivation de la latence par expression de NCoA3 dans les cellules infectées ?</i> .....	104
2.4.	<b>Analyse de l'implication du gène <i>IRF8</i> dans l'établissement et le maintien de la latence du VIH-1</b> .....	<b>105</b>
2.4.1.	<i>IRF8 : Interferon Regulatory Factor 8</i> .....	105
2.4.2.	<i>Modification de l'expression du gène <i>IRF8</i> dans les cellules U1 infectées de façon latente et stimulées par le NaB</i> .....	108
2.4.3.	<i>Répression transcriptionnelle de l'élément ISRE du VIH-1 par <i>IRF8</i></i> .....	109
2.4.4.	<i>Etude des interactions entre Tat, <i>IRF1</i> et <i>IRF8</i></i> .....	110
2.4.5.	<i>Etude du recrutement du facteur <i>IRF8</i> sur le LTR</i> .....	111
2.4.6.	<i>Réactivation de la latence par inhibition de l'expression d'<i>IRF8</i> dans les cellules infectées ?</i> .....	112
2.5.	<b>Conclusion</b> .....	<b>113</b>
	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>114</b>
1.	<b>INFECTION DU TISSU ADIPEUX HUMAIN PAR LE VIH-1 : UN NOUVEAU TISSU CIBLE ?</b> .....	<b>114</b>
1.1.	Expression transcriptionnelle du provirus ? .....	115
1.2.	Transcription inverse et intégration du provirus ?.....	116
1.3.	Blocage au niveau de l'entrée virale ?.....	117
1.4.	Expression des récepteurs du VIH-1 ? .....	118
1.5.	Infection permissive si expression des récepteurs ? .....	119
1.6.	Susceptibilité des cellules du tissu adipeux à l'infection par le VIH-1 ?.....	120
1.7.	Le tissu adipeux, un nouveau réservoir ? .....	121
2.	<b>RECHERCHE DE GENES CELLULAIRES CANDIDATS IMPLIQUES DANS LE CONTROLE DE LA LATENCE DU VIH-1</b> .....	<b>122</b>
2.1.	Analyse du transcriptome différentiel de lignées cellulaires infectées par le VIH-1 par micropuces à haute densité .....	123
2.2.	Implication du gène <i>NCoA3</i> dans la réactivation de la latence du VIH-1 ? .....	127
2.3.	Implication du gène <i>IRF8</i> dans l'établissement et le maintien de la latence du VIH-1 ? .....	132
2.4.	Perspectives.....	137
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>139</b>

## ***ABRÉVIATIONS***

CDK9	Cyclin-Dependent Kinase 9
CTD	C-Terminal Domain
DBD	DNA Binding Domain
DHS	DNase I Hypersensitive Site
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HAT	Histone Acetyltransferase
HDAC	Histone Deacetylase
HMT	Histone Methyltransferase
IAD	IRF Association Domain
IRF	Interferon Regulatory Factor
ISG	Interferon Stimulated Gene
ISRE	IFN Stimulated Response Element
LTR	Long Terminal Repeat
NCoA	Nuclear Receptor Coactivator
NCoR	Nuclear Corepressor
NES	Nuclear Export Signal
NF-AT	Nuclear Factor of Activated T cells
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor- $\kappa$ B
NLS	Nuclear Localization Signal
p160/SRC	p160 Steroid Receptor Coactivator
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PIC	Preintegration Complex
PMA	Phorbol Myristyl Acetate
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor b
Rev	Regulation of expression of viral proteins
RRE	Rev Responsive Element
RTC	Reverse Transcription Complex
SWI/SNF	Switch/Sucrose Non Fermenting
TAR	Transactivation Responsive element
Tat	Transactivator of transcription
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

# **INTRODUCTION**

# **INTRODUCTION**

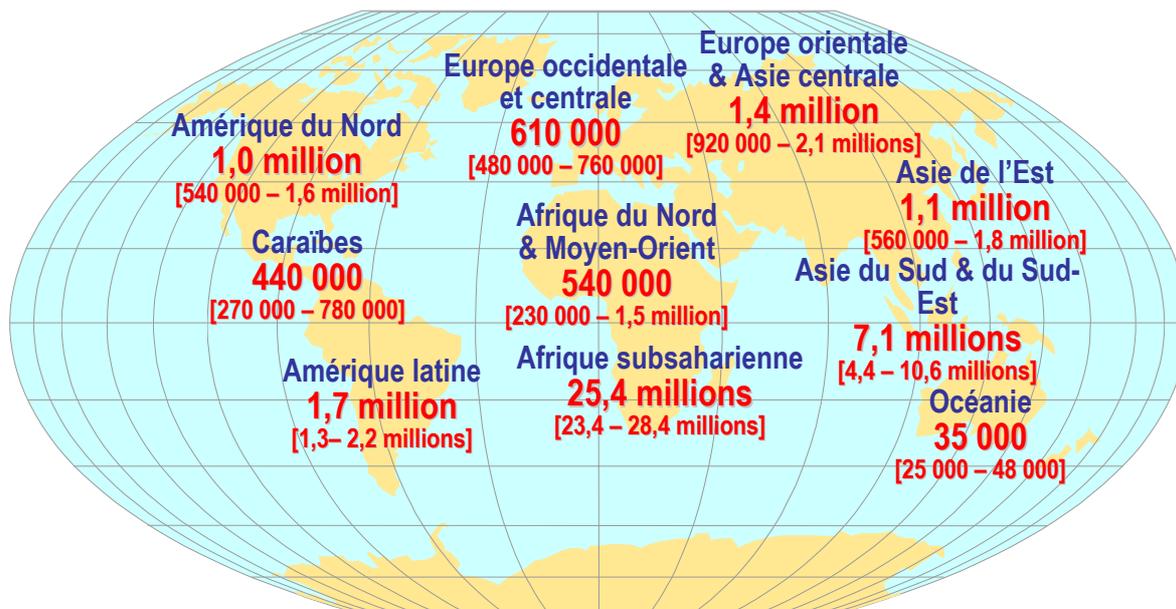
## **1. LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH-1)**

### **1.1.SIDA et VIH-1**

Le Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) a tout d'abord été observé aux Etats-Unis en 1981 chez quatre jeunes homosexuels qui présentaient une pneumonie à *Pneumocystis carinii* associée à une immunodéplétion sévère des cellules T. Les études cliniques et épidémiologiques ont rapidement révélé que ce syndrome était causé par un agent infectieux transmis par voie sexuelle et sanguine. C'est en 1983 que l'agent étiologique du SIDA est isolé à partir d'un ganglion lymphatique d'un patient présentant une lymphoadénopathie. Il s'agit d'un rétrovirus, initialement baptisé LAV (« Lymphadenopathy-Associated Virus »), qui sera ensuite renommé Virus de l'Immunodéficience Humaine-1 ou VIH-1 (pour revues (Barre-Sinoussi, 2003; Fauci, 2003)).

### **1.2.Epidémiologie liée au VIH-1**

Depuis le début de la pandémie, le VIH a infecté plus de 60 millions de personnes, dont près de 23 millions sont décédées de pathologies associées au SIDA. Fin 2004, le programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA : <http://www.unaids.org>) estime que près de 40 millions de personnes sont infectées par le VIH-1. En un an, 5 millions de personnes ont été nouvellement touchées et plus de 3 millions de personnes sont mortes. Et l'épidémie ne cesse de progresser. La prévalence la plus élevée est observée en Afrique subsaharienne avec près de deux tiers des cas. En Asie et dans le Pacifique, l'incidence du



- **Personnes vivant avec le VIH/SIDA----- 39,4 millions [35,9 – 44,3 millions]**
- **Nouveaux cas d'infection à VIH en 2004---- 4,9 millions [4,3 – 6,4 millions]**
- **Décès dus au VIH/SIDA en 2004----- 3,1 millions [2,8 – 3,5 millions]**

**Figure 1. Distribution géographique de l'épidémie d'infection à VIH/SIDA dans le monde à la fin 2004.**

Estimation du nombre de personnes vivant avec le VIH dans les principales régions du monde à la fin de l'année 2004, d'après le programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONUSIDA : <http://www.unaids.org>).

SIDA augmente avec plus d'un million de nouvelles contaminations en 2004. Dans les pays occidentaux, la mortalité associée au SIDA continue de baisser grâce à la mise à disposition du traitement antirétroviral. La **Figure 1** représente la distribution géographique de la pandémie liée au VIH-1 à la fin de l'année 2004.

### **1.3. Physiopathologie de l'infection par le VIH-1**

L'évolution clinique de l'infection par le VIH-1 comporte trois phases chronologiques : une phase de primo-infection, une phase asymptomatique ou phase de latence clinique et une phase correspondant à l'apparition du stade SIDA (pour revue (Weber, 2001)) (**Figure 2**).

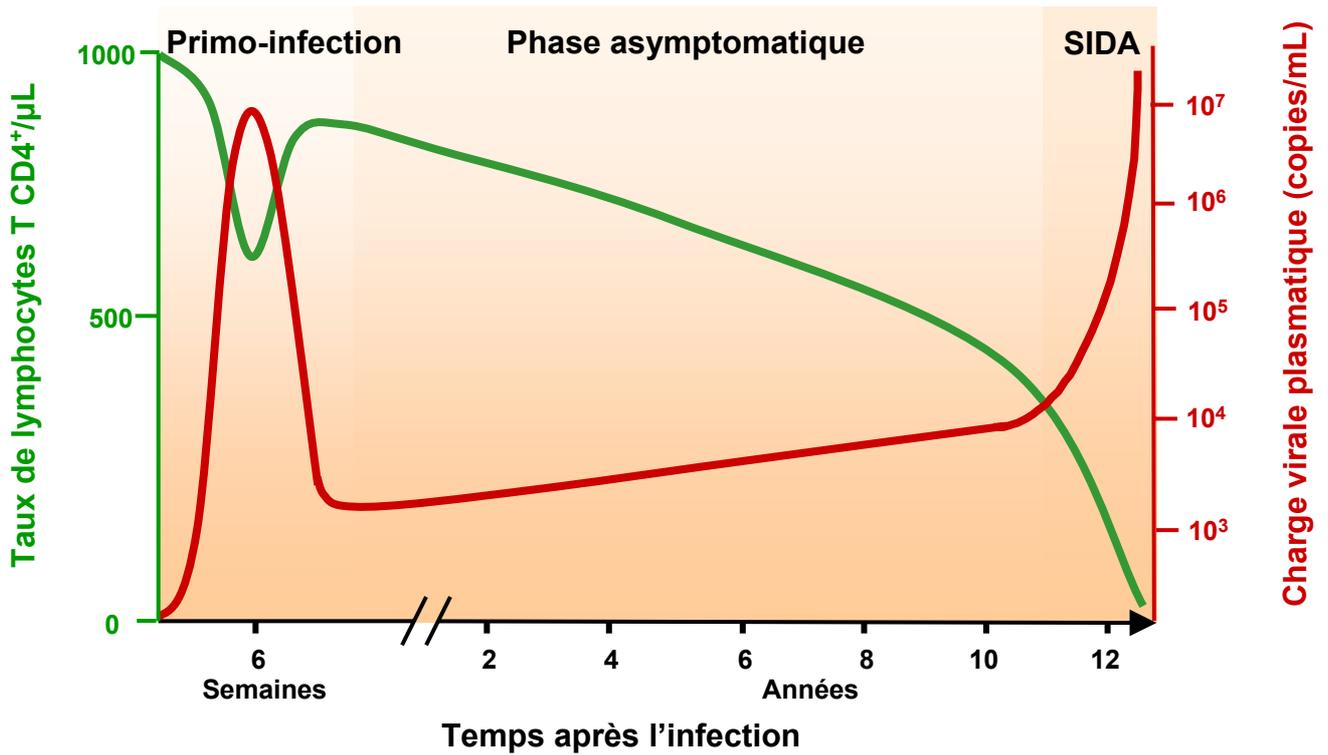
#### **1.3.1. Primo-infection**

La primo-infection est caractérisée par une réplication virale massive qui se traduit par une augmentation de la quantité de virus dans le plasma (charge virale plasmatique). Elle peut s'accompagner de symptômes associés à la séroconversion mais est le plus souvent asymptomatique. Lors de cette phase, le VIH-1 est disséminé dans les organes lymphoïdes et s'établit dans des réservoirs viraux de latence. La charge virale plasmatique diminue ensuite spontanément alors qu'une réponse immunitaire spécifique se développe.

Le pic de virémie initial est associé à une diminution transitoire de la quantité de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants dans le sang. Lorsque la charge virale plasmatique est contrôlée, le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> remonte mais reste à un niveau légèrement inférieur à celui avant infection.

#### **1.3.2. Phase asymptomatique ou phase de latence clinique**

Intervient ensuite la phase de latence clinique, ou phase asymptomatique, qui peut durer plusieurs années. Elle est caractérisée par une stabilisation de la charge virale plasmatique et une diminution très progressive du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants. Durant la



**Figure 2. Evolution clinique de l'infection par le VIH-1.**

Les trois phases de l'infection par le VIH-1 sont représentées par l'évolution de la charge virale plasmatique (quantité de virus dans le plasma, en rouge) et du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants (en vert) au cours du temps.

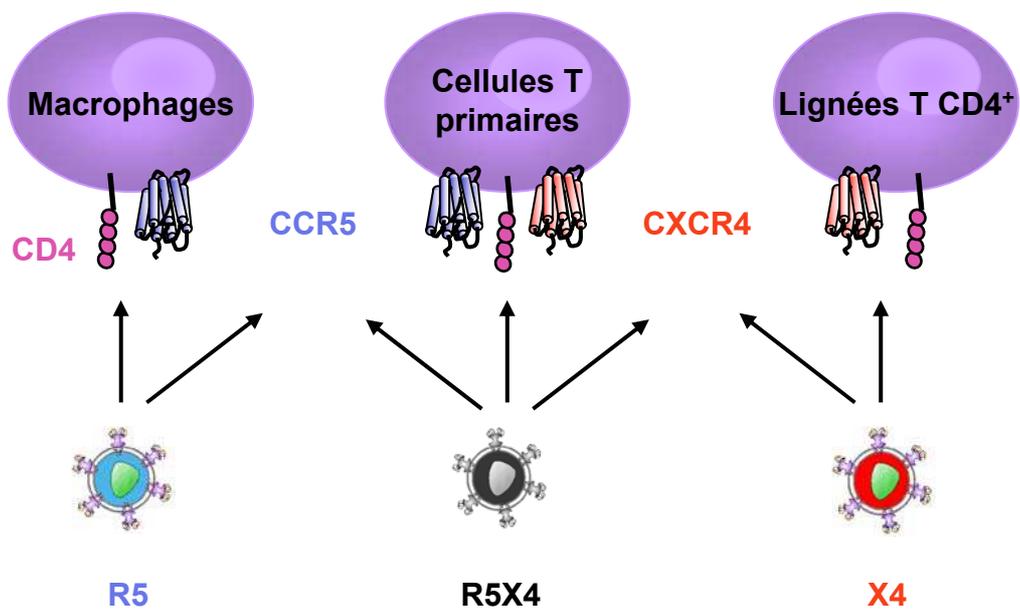
phase de latence clinique, le virus continue de se répliquer dans les organes lymphoïdes même si la charge virale plasmatique reste faible. Il existe un équilibre dynamique entre le taux de réplication du virus, l'élimination des cellules T CD4<sup>+</sup> infectées et le renouvellement de ces cellules.

### **1.3.3. Phase SIDA**

Le stade SIDA est caractérisé par la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants et par une augmentation rapide de la réplication virale. La chute du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en dessous de 200/ $\mu$ L conduit à l'apparition de maladies opportunistes et de tumeurs, qui sont responsables du décès de l'individu.

## **1.4. Tropisme du VIH-1**

*In vivo*, les cellules permissives à l'infection par le VIH-1 sont majoritairement les cellules du système immunitaire exprimant à leur surface la molécule CD4 : les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les cellules de la lignée monocytes/macrophages (pour revue (Levy, 1993)). La molécule CD4 a ainsi été identifiée comme étant le principal récepteur du VIH-1 (Klatzmann et al., 1984). Cependant, il est apparu que la molécule CD4 n'était pas suffisante à l'entrée du virus. En effet, différents isolats du VIH-1 présentent des différences de tropisme vis-à-vis des cellules CD4<sup>+</sup>. Bien que tous les isolats du VIH-1 puissent infecter efficacement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires, certains isolats, appelés lymphocytotropes (ou « T-tropic »), infectent efficacement les lignées cellulaires T CD4<sup>+</sup> mais sont incapables d'infecter des cultures primaires de monocytes/macrophages. Au contraire, certains isolats, appelés monocytootropes (ou « M-tropic »), infectent préférentiellement des cultures primaires de macrophages et infectent difficilement les lignées lymphocytaires T CD4<sup>+</sup>. Enfin, les souches virales qui infectent efficacement tous ces types cellulaires sont désignées à double tropisme (pour revue (Berger, 1997)).



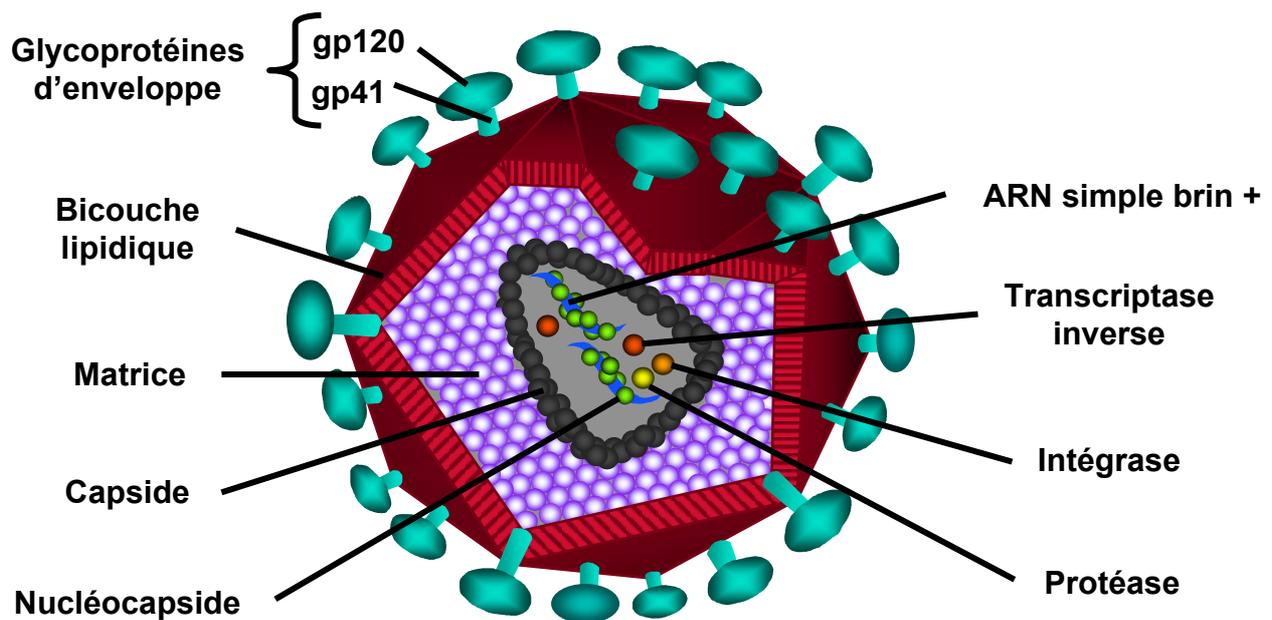
**Figure 3. Classification des différentes souches de VIH-1.**

La molécule CD4 est le principal récepteur du VIH-1. Le VIH-1 utilise également un second récepteur cellulaire appelé corécepteur. Les souches virales qui utilisent le corécepteur CXCR4 sont appelées X4, celles qui utilisent le corécepteur CCR5 sont appelées R5 et celles qui sont capables d'utiliser les deux corécepteurs sont appelées R5X4.

Ces différences de tropismes sont dues à l'utilisation par le VIH-1 d'un second récepteur, ou corécepteur. Les corécepteurs du VIH-1 identifiés appartiennent à la famille des récepteurs aux chimiokines, qui sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (pour revue (Berger et al., 1999)). Les deux principaux corécepteurs utilisés *in vivo* sont CXCR4, un récepteur aux  $\alpha$ -chimiokines, et CCR5, un récepteur aux  $\beta$ -chimiokines. L'utilisation différentielle de CXCR4 et de CCR5 par le VIH-1 et l'expression de ces corécepteurs à la surface des cellules CD4<sup>+</sup> a permis d'expliquer les différences de tropisme du VIH-1. En effet, les lignées lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> expriment CXCR4, les macrophages primaires expriment CCR5, et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires expriment CXCR4 et CCR5. Ainsi, les isolats lymphocytotropes, qui utilisent CXCR4, sont de tropisme X4 ; les isolats monocytootropes, qui utilisent CCR5, sont de tropisme R5 ; et les souches à double tropisme, qui peuvent utiliser les deux corécepteurs, sont de tropisme R5 X4 (pour revue (Berger et al., 1999)) (**Figure 3**).

### 1.5. Particule virale

Le virus de l'immunodéficience humaine appartient à la famille des *Retroviridae* et au genre *lentivirus*. Le VIH-1 est un virus enveloppé à symétrie icosaédrique, de 110 à 120 nm de diamètre, dont le génome est composé de deux copies identiques d'ARN simple brin de polarité positive. La structure de la particule virale du VIH-1 est représentée **Figure 4**. L'enveloppe virale est une bicouche lipidique provenant de la cellule hôte dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe, ou spicules, constituées de deux sous-unités : la gp120 extramembranaire et la gp41 transmembranaire. Les protéines de matrice sont ancrées à la face interne de l'enveloppe virale. La capsid, qui forme le « core » viral, renferme les enzymes virales (protéase, intégrase et transcriptase inverse) et le génome viral, comprenant



**Figure 4. Particule virale du VIH-1.**

Le VIH-1 est un virus enveloppé à symétrie icosaédrique de 110 à 120 nm de diamètre. Les deux copies identiques d'ARN simple brin de polarité positive, auxquelles sont associées les protéines de nucléocapside, sont enfermées dans la capside avec les enzymes virales : transcriptase inverse, intégrase et protéase. La capside est entourée par une matrice. La particule virale est enveloppée par une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41.

les deux copies d'ARN simple brin de polarité positive, auquel sont associées les protéines de nucléocapside.

## 1.6. Génome du VIH-1

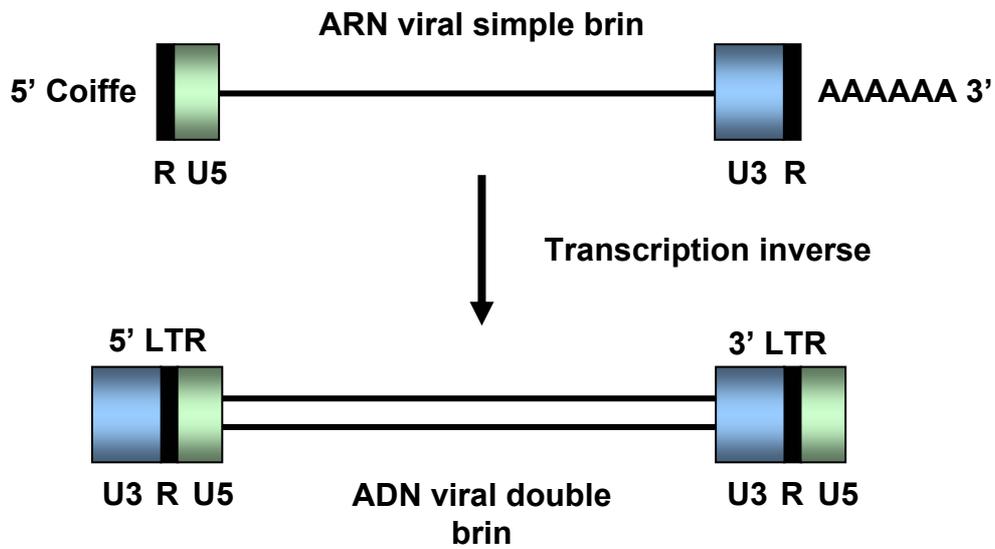
Le génome du VIH-1 est constitué de deux molécules d'ARN simple brin d'environ 9200 nt de polarité positive. L'ARN viral, coiffé en 5' et polyadénylé en 3', est encadré par deux courtes séquences répétées R adjacentes aux séquences uniques U5 et U3 présentes, respectivement, aux extrémités 5' et 3' de l'ARN. Dans la cellule hôte, la rétrotranscription de l'ARN viral simple brin en ADN double brin génère une duplication des séquences U5 et U3 qui conduit à la formation de séquences répétées directes aux deux extrémités du génome viral : les LTR (« Long Terminal Repeat »), constitués des régions U3, R et U5 (**Figure 5**). La région U3 du LTR 5' contient le promoteur viral. La transcription est initiée à la jonction U3-R du LTR 5' et se termine au signal de polyadénylation localisé dans la région R du LTR 3'.

Le génome du VIH-1 (**Figure 6**) code trois familles de protéines : les protéines de structure, les protéines régulatrices, et les protéines auxiliaires (pour revue (Freed, 2001)).

### 1.6.1. Protéines de structure

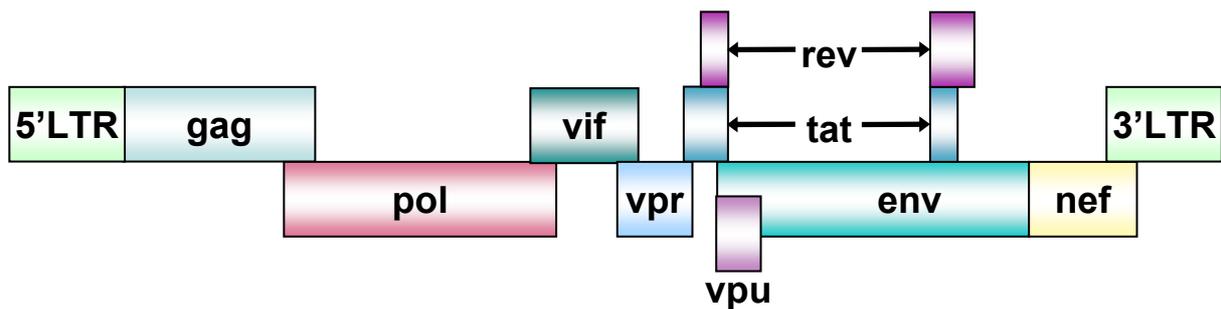
Les protéines de structure sont codées par les gènes *gag*, *pol* et *env*, communs à tous les rétrovirus.

- Le gène *gag* (« group-specific antigen ») code le précurseur Gag de 55 kDa, ou pr55, dont le clivage par la protéase virale permet la formation des protéines de matrice (MA, p17), de capsid (CA, p24), de nucléocapside (NC, p7) et d'un polypeptide p6.
- Le gène *pol* (« polymerase ») code le précurseur Gag-Pol de 160 kDa, ou pr160, qui est synthétisé suite à un événement rare de décalage de la phase de lecture lors de la traduction du précurseur Gag. Le clivage du précurseur Gag-Pol par la protéase virale



**Figure 5. Structure du génome viral.**

L'ARN contenu dans la particule virale est borné par deux courtes séquences répétées R à côté desquelles se trouvent les séquences uniques U5 et U3. L'ARN viral est coiffé en 5' par une guanosine méthylée et il est polyadénylé en 3'. Dans la cellule hôte, l'ARN viral simple brin est converti en ADN double brin. Ce processus génère la formation de séquences répétées directes : les LTR, aux deux extrémités du génome viral.



**Figure 6. Organisation génomique du VIH-1.**

Le génome du VIH-1 code les gènes de structure (*gag*, *pol*, *env*), les gènes des protéines régulatrices (Tat, Rev) et les gènes des protéines auxiliaires (Vif, Vpr, Vpu, Nef). Le LTR 5' contient le promoteur viral de classe II situé dans la région U3.

conduit à l'expression des enzymes virales : la protéase (PR), l'intégrase (IN) et la transcriptase inverse (RT).

- Le gène *env* (« envelope ») code le précurseur glycoprotéique Env ou gp160 qui est clivé par une protéase cellulaire en deux sous-unités : la glycoprotéine d'enveloppe extramembranaire gp120 (SU) et la glycoprotéine d'enveloppe transmembranaire gp41 (TM).

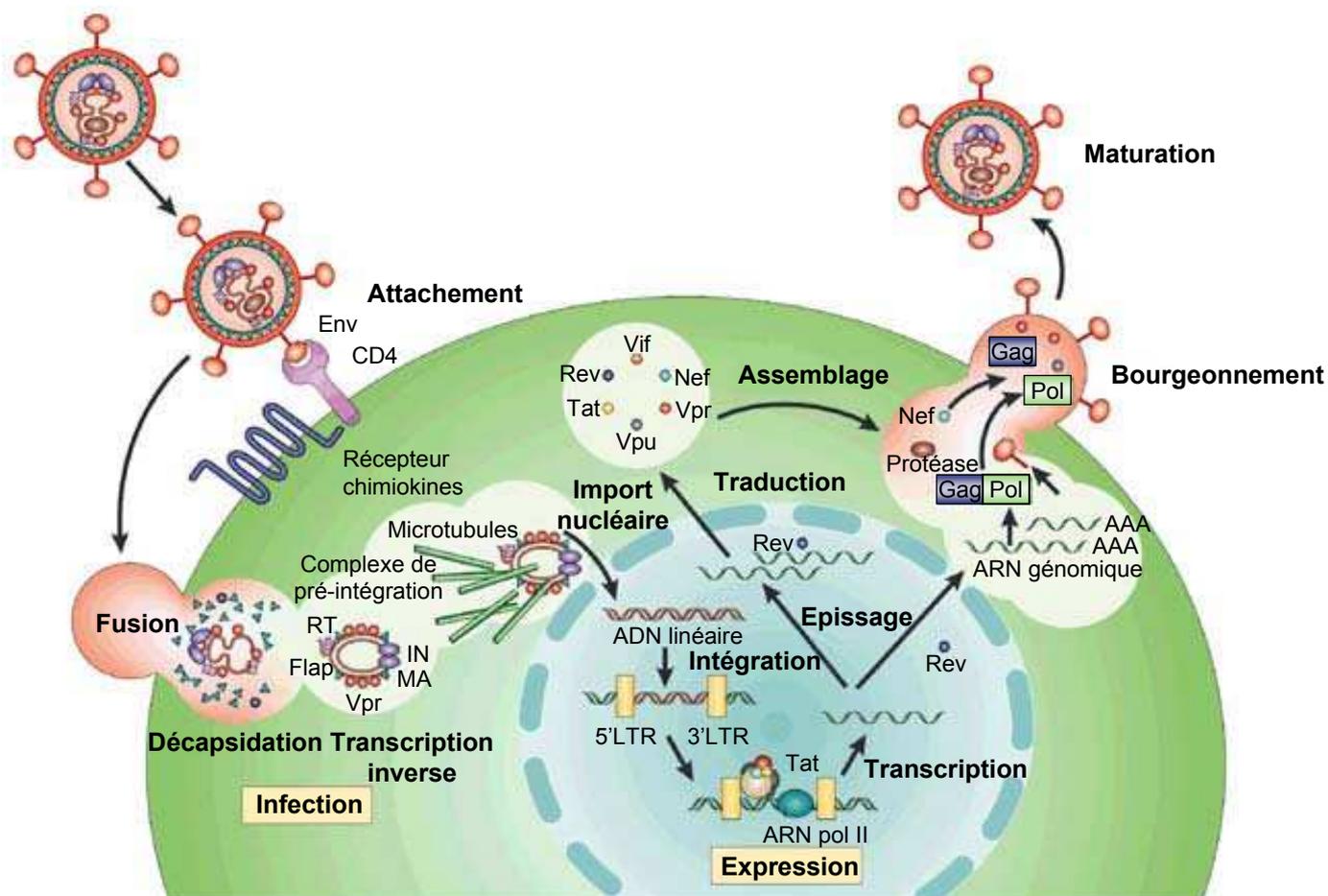
### 1.6.2. Protéines régulatrices

Les protéines régulatrices sont codées par les gènes *tat* et *rev* (pour revue (Strebel, 2003)).

- Le gène *tat* code la protéine Tat (« Transactivator of transcription ») qui régule la transcription du promoteur viral. Sa séquence cible, l'ARN TAR (« Transactivation Responsive element »), est présente à l'extrémité 5' de tous les transcrits viraux.
- Le gène *rev* code la protéine Rev (« Regulation of expression of viral proteins ») qui régule la transition entre les phases précoces et tardives de l'expression des gènes viraux en permettant l'export nucléaire des ARN longs vers le cytoplasme après interaction avec la séquence d'ARN RRE (« Rev Responsive Element ») située dans le gène *env*.

### 1.6.3. Protéines auxiliaires

Le génome du VIH-1 code également pour 4 protéines auxiliaires : Vif (« Viral infectivity factor »), Vpr (« Viral protein r »), Vpu (« Viral protein u ») et Nef (« Negative effector ») (pour revue (Anderson and Hope, 2003)). Ces protéines dites auxiliaires sont néanmoins essentielles *in vivo* à la réplication virale. Les fonctions de ces protéines seront décrites dans le chapitre 3.



**Figure 7. Cycle de réplication du VIH-1.**

L'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe virale et les récepteurs cellulaires permet la fusion des membranes virales et cellulaires. Après décapsulation, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN double brin par la transcriptase inverse. Le complexe de pré-intégration est importé activement dans le noyau et l'ADN viral est intégré dans le génome cellulaire par l'intégrase. L'ADN proviral peut alors être transcrit en différents ARNm qui seront traduits en protéines structurales, régulatrices et auxiliaires. L'ARN viral est assemblé dans des particules virales immatures qui vont bourgeonner à la membrane cellulaire. La maturation de la particule virale par la protéase virale permet la formation d'un virion infectieux. D'après Peterlin and Trono, 2003.

## **1.7.Cycle viral**

Le cycle viral du VIH-1 peut être divisé en deux grandes étapes : précoces et tardives (pour revue (Freed, 2001)) (**Figure 7**).

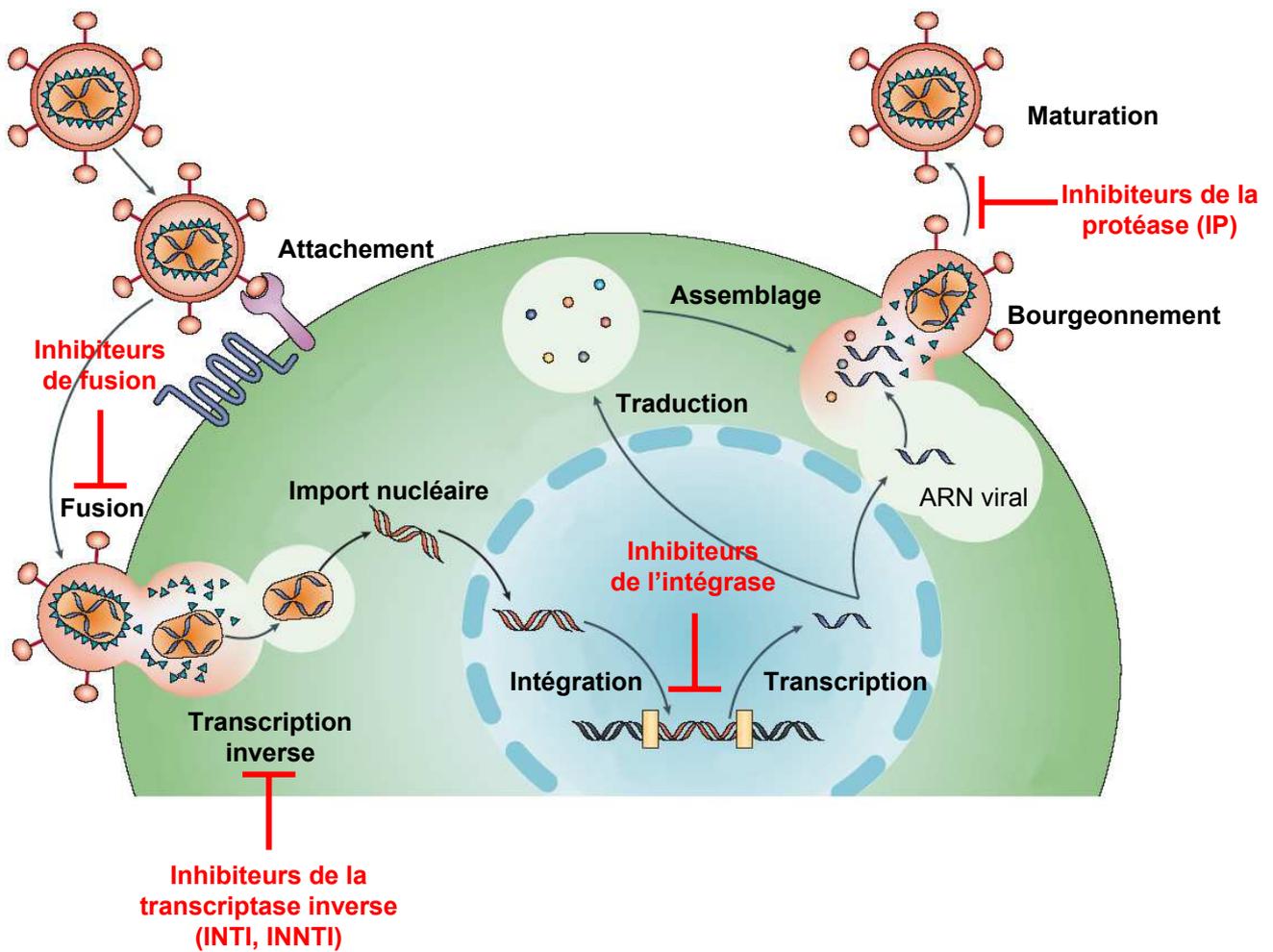
### **1.7.1. Etapes précoces**

Le processus d'entrée du virus dans la cellule débute par la fixation de la gp120 au récepteur cellulaire CD4 puis au corécepteur CXCR4 ou CCR5. Cette interaction va induire la fusion des membranes virale et cellulaire qui conduit à la libération du « core » viral dans le cytoplasme. Après un processus de décapsidation, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN double brin linéaire par la transcriptase inverse au sein du complexe RTC (« Reverse Transcription Complex »). Le complexe de pré-intégration ou PIC (« Preintegration Complex ») est ensuite importé de manière active dans le noyau de la cellule.

### **1.7.2. Etapes tardives**

L'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire est catalysé par l'intégrase. La transcription de l'ADN proviral conduit à la synthèse des ARNm viraux qui sont exportés vers le cytoplasme pour y être traduits. La particule virale est assemblée à la membrane plasmique de la cellule infectée où certains ARNm de taille génomique interagissent avec les précurseurs Gag et Gag-Pol pour former les nucléocapsides. La particule immature bourgeonne à la membrane plasmique dans laquelle sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe virale. Le clivage des précurseurs Gag et Gag-Pol par la protéase virale permet la formation de particules virales matures capables d'infecter de nouvelles cellules.

Les différentes étapes du cycle viral seront détaillées dans le chapitre 3.



**Figure 8. Cibles des molécules anti-VIH-1.**

Les étapes du cycle viral inhibées par les molécules anti-VIH-1 sont la transcription inverse et la maturation des particules virales. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse regroupent les inhibiteurs nucléosidiques (INTI) et non nucléosidiques (INNTI). Les inhibiteurs de la protéase (IP) ciblent l'étape de maturation. Des inhibiteurs de fusion et de l'intégrase sont actuellement développés.

## **1.8. Traitements antirétroviraux**

L'analyse du mécanisme de la réplication du VIH-1 a permis le développement de molécules dirigées contre des étapes spécifiques du cycle viral.

### **1.8.1. Cibles des traitements antirétroviraux**

Les molécules actuellement disponibles contre le VIH-1 appartiennent à deux grandes catégories : les inhibiteurs de la transcriptase inverse et les inhibiteurs de la protéase qui inhibent respectivement la transcription inverse du génome viral et la maturation des particules virales (pour revue (Pomerantz and Horn, 2003)) (**Figure 8**). Il existe deux types d'inhibiteurs de la transcriptase inverse : les inhibiteurs nucléosidiques (ou INTI) et non nucléosidiques (ou INNTI). Les INTI sont incorporés par la transcriptase inverse dans le brin d'ADN en cours de synthèse et provoquent un arrêt prématuré de la transcription inverse. Les INTI commercialisés sont : Zidovudine (AZT), Didanosine (ddI), Lamivudine (3TC), Stavudine (d4T), Abacavir (ABC) et Zalcitabine (ddC). Les INNTI agissent directement sur la transcriptase inverse en se fixant à proximité du site actif de l'enzyme et en altérant ainsi sa fonction. Les INNTI commercialisés sont : Efavirenz, Nevirapine et Delavirdine. Les inhibiteurs de la protéase (IP) sont des peptides mimant le substrat naturel de l'enzyme qui se logent dans le site actif de l'enzyme et empêchent ainsi le clivage des protéines virales et la maturation des particules virales qui ne sont donc pas infectieuses. Les IP disponibles sont : Indinavir, Ritonavir, Nelfinavir, Saquinavir, Amprenavir et Lopinavir. Actuellement des inhibiteurs de l'intégrase et des inhibiteurs de fusion (T-20) sont développés (pour revue (Pomerantz and Horn, 2003)).

### **1.8.2. Effets des thérapies antirétrovirales sur la réplication du VIH-1 et le risque de progression vers le SIDA**

Les thérapies antirétrovirales réduisent considérablement le risque de progression vers le SIDA et la réplication virale, comme en témoigne la diminution de la charge virale

plasmatique. Cependant, les effets positifs des traitements anti-VIH-1, lorsqu'ils ne comportent qu'un seul inhibiteur de la réplication virale, sont de courte durée du fait de l'émergence rapide de mutations conférant au virus la possibilité de résister aux molécules antirétrovirales. Ainsi, chez les patients recevant une combinaison de plusieurs inhibiteurs, le risque de progression vers le SIDA et d'émergence de virus résistants est considérablement diminué (pour revue (Pomerantz and Horn, 2003)). Les traitements antirétroviraux constitués d'une combinaison d'au moins trois inhibiteurs (HAART, « Highly Active Antiretroviral Therapy ») se sont donc généralisés. Ces traitements comportent généralement deux INTI et une troisième molécule : un IP, un INNTI ou un troisième INTI.

L'introduction du traitement par HAART a permis de diminuer considérablement la mortalité liée à l'infection par le VIH-1 et d'améliorer la qualité de vie des patients infectés. De plus, le traitement par HAART a permis de réduire la charge virale plasmatique à des niveaux indétectables chez de nombreux patients (limite de détection : 50 copies d'ARN viral/mL de plasma).

Cependant, ces multi-thérapies, administrées de façon chronique, provoquent à long terme de nombreux effets secondaires. Des désordres métaboliques apparaissent (insulino-résistance, hyperlipidémie, hypercholestérolémie, hypertriglycémie), ainsi qu'une redistribution des masses graisseuses appelée syndrome de lipodystrophie (Gougeon et al., 2004). En outre, les traitements antirétroviraux actuels ne permettent pas l'éradication du virus. Ainsi, le virus persiste toujours au sein de son hôte dans les réservoirs cellulaires (Blankson et al., 2002).

## 2. RESERVOIRS DE LATENCE ET DE PERSISTANCE DU VIH-1

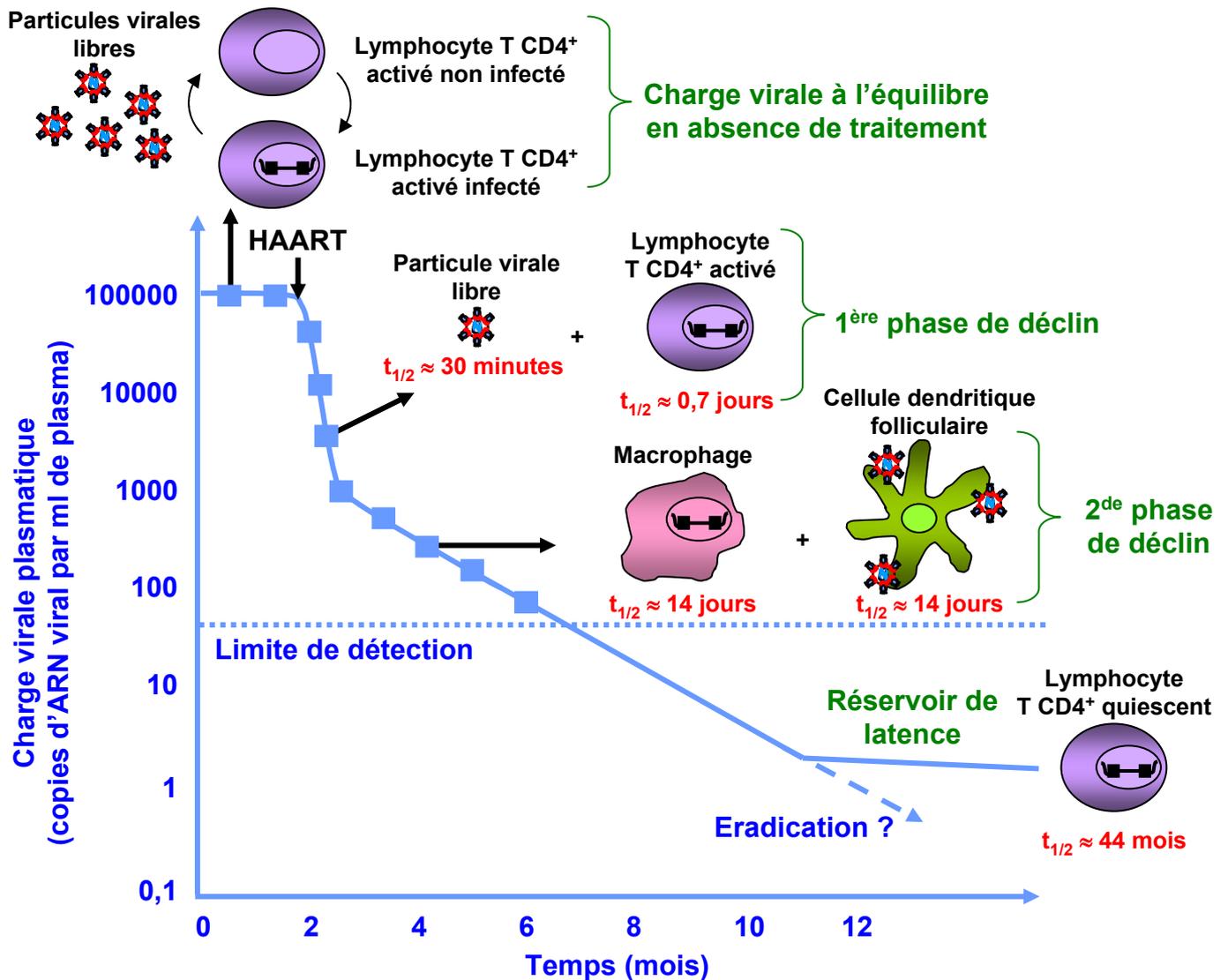
Un réservoir viral est un type cellulaire ou un site anatomique dans lequel les formes virales compétentes pour la réplication s'accumulent et persistent avec des propriétés cinétiques plus stables que celles des formes virales se répliquant activement. La latence est un état d'infection non productive et réversible. En d'autres termes, la latence décrit une cellule infectée qui ne produit pas de virus mais qui garde cette capacité après réactivation. Un réservoir viral n'est pas forcément latent puisque qu'une population cellulaire infectée de façon productive et ayant un renouvellement lent peut constituer un réservoir. Cependant, dans le cas de l'infection par le VIH-1, le réservoir principal est constitué des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents mémoires infectée de façon latente (pour revues (Blankson et al., 2002; Pierson et al., 2000b)).

### 2.1. Dynamique de l'infection virale *in vivo*

L'analyse quantitative de la réplication virale *in vivo* a permis une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'infection par le VIH-1. Notamment, la perturbation de l'équilibre dynamique entre le taux de réplication du virus, l'élimination des cellules infectées et leur renouvellement par un traitement antirétroviral a permis de déterminer le rôle des différents compartiments cellulaires (pour revue (Simon and Ho, 2003)).

#### 2.1.1. Première phase de déclin

Les cellules produisant la majorité des particules virales (93-99%) présentes dans le plasma sont les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés (Zhang et al., 1999b). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés meurent rapidement après infection, soit à cause des effets cytopathogènes du virus, soit à cause de la réponse immunitaire spécifique (Grossman et al., 2002). Le niveau stable de



**Figure 9. Dynamique de la réplication virale sous traitement.**

En absence de traitement, la charge virale plasmatique reflète l'équilibre entre le taux de réplication du virus, l'élimination des cellules infectées et leur renouvellement. Les traitements antirétroviraux (HAART) permettent de diminuer la charge virale plasmatique jusqu'à des niveaux indétectables (< 50 copies d'ARN viral/mL de plasma). La première phase de déclin est une diminution exponentielle rapide de la charge virale d'environ 2 log qui correspond à l'élimination des particules virales libres et des cellules T CD4<sup>+</sup> activées infectées. La seconde phase de déclin est une diminution exponentielle plus lente de la charge virale plasmatique qui correspond à l'élimination des macrophages et des cellules dendritiques folliculaires infectés dont la demi-vie est d'environ 2 semaines. En extrapolant la seconde phase de déclin, l'éradication de l'infection pourrait être obtenue en quelques années en maintenant un traitement antirétroviral efficace. Cependant, l'existence d'un réservoir de latence stable constitué par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents dont la demi-vie est d'environ 44 mois rend l'éradication de l'infection par le VIH-1 difficile. D'après Persaud et al., 2003.

la virémie chez un patient non traité implique donc un processus d'infection continue de nouvelles cellules à un niveau équilibrant celui de leur mort rapide (**Figure 9**).

Après initiation d'un traitement utilisant un IP ou un INTI, la charge virale plasmatique chute rapidement et de façon exponentielle (diminution de 2 log) (Ho et al., 1995; Wei et al., 1995). La chute rapide de la virémie suggère que la demi-vie des virus et des cellules qui les produisent est très courte (Ho et al., 1995; Perelson et al., 1996; Wei et al., 1995). En effet, la demi-vie d'un virus dans le plasma est de 30 minutes et celle des cellules qui produisent les virus est de 0,7 jours (Markowitz et al., 2003) (**Figure 9**).

### **2.1.2. Deuxième phase de déclin**

La combinaison de plusieurs molécules antirétrovirales provoque une diminution de la charge virale à des niveaux indétectables. L'analyse cinétique de la décroissance virale après initiation d'une multi-thérapie indique qu'elle est biphasique (Perelson et al., 1997). Après la chute rapide de 2 log durant les deux premières semaines de traitement, la charge virale plasmatique diminue plus progressivement (**Figure 9**). Cette seconde phase de déclin plus lente est attribuée à l'élimination d'une population différente de cellules infectées qui succombent moins vite à l'infection par le VIH-1 que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés. Ces cellules contribuent à une petite proportion de la charge virale plasmatique (1-7%). La demi-vie du compartiment cellulaire responsable de la deuxième phase de déclin est estimée à 1-4 semaines (Perelson et al., 1997).

Les populations cellulaires pouvant contribuer à cette seconde phase de déclin sont principalement les macrophages et les cellules dendritiques folliculaires. Les macrophages sont moins susceptibles aux effets cytopathogènes de l'infection et produisent continuellement de nouvelles particules virales (Ho et al., 1986). Le renouvellement des macrophages est assuré par la production de monocytes dans la moelle osseuse et la demi-vie des macrophages tissulaires est d'environ 2 semaines (Van Furth, 1989). La seconde phase de

déclin est également attribuée à l'élimination des cellules dendritiques folliculaires (FDC, « Follicular Dendritic Cell ») des centres germinatifs des tissus lymphoïdes périphériques. Les FDC ne sont pas susceptibles à l'infection par le VIH-1 mais peuvent capturer les particules virales à leur surface et retenir leur infectivité (Smith et al., 2001). La demi-vie de ce compartiment est de 2 semaines (Cavert et al., 1997), ce qui est compatible avec la cinétique de la seconde phase de déclin.

### **2.1.3. Hypothèse de l'éradication**

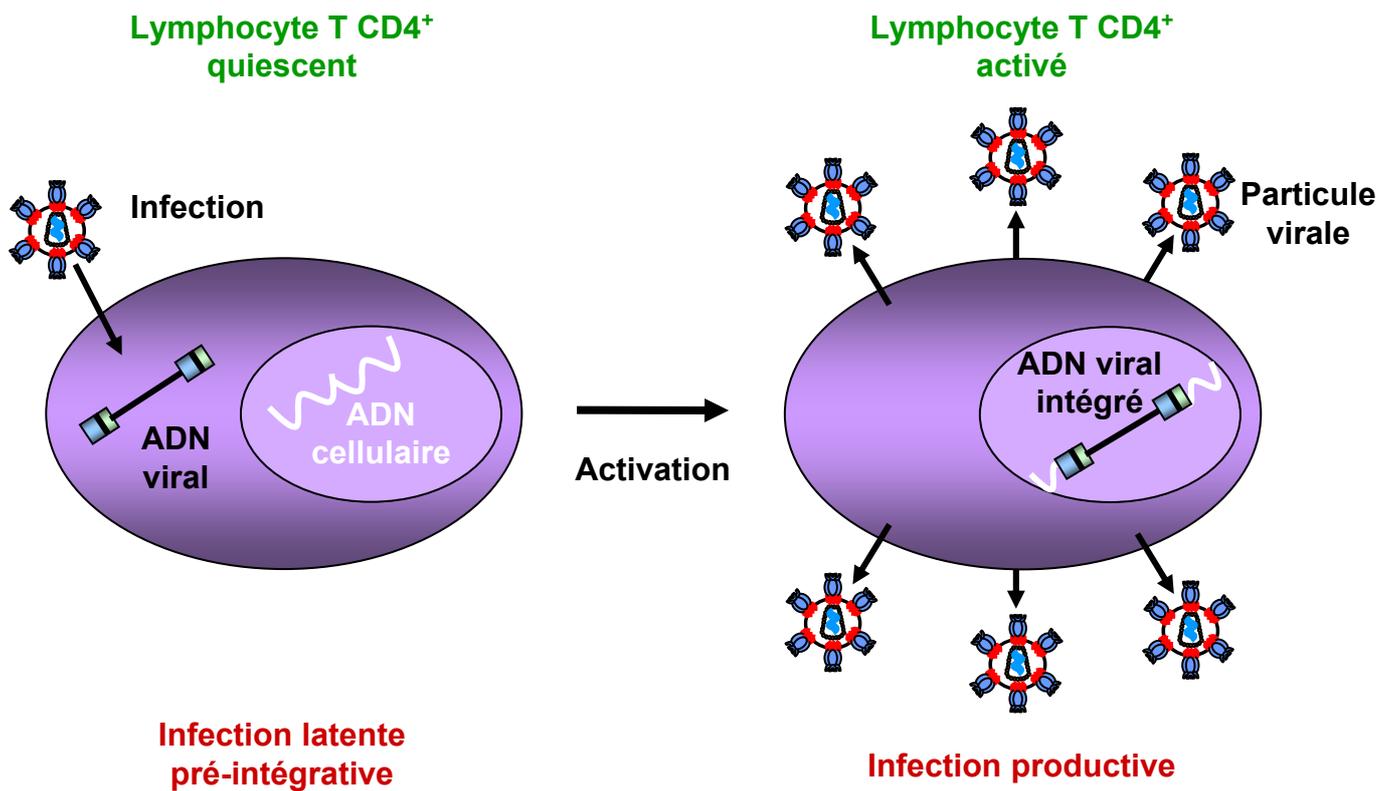
En extrapolant la seconde phase de déclin, et en faisant l'hypothèse que les molécules antirétrovirales empêchent l'infection de nouvelles cellules et qu'il n'existe pas d'autres réservoirs viraux, Perelson et collaborateurs ont suggéré qu'un traitement antirétroviral maintenu pendant deux à trois ans pourrait permettre l'éradication de l'infection (Perelson et al., 1997) (**Figure 9**). Cependant, il est rapidement apparu que les traitements antirétroviraux n'empêchent pas complètement la réplication virale. De plus, l'existence d'un réservoir de latence stable constitué par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents mémoires rend l'éradication de l'infection par le VIH-1 difficile.

## **2.2. Réservoir de latence : lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents mémoires**

### **2.2.1. Bases physiologiques de l'infection latente des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

L'infection latente des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents est expliquée par la physiologie des cellules T (pour revue (Pierson et al., 2000b)). En effet, il existe une relation entre l'état d'activation du lymphocyte T CD4<sup>+</sup> infecté et sa capacité à produire du virus.

La capacité du VIH-1 à infecter une cellule T CD4<sup>+</sup> quiescente ou activée dépend du niveau d'expression des récepteurs et corécepteurs d'entrée du VIH-1 et du tropisme de la souche virale. Les virus de tropisme R5 peuvent infecter les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires exprimant des niveaux suffisants du corécepteur CCR5 (Pierson et al., 2000a) mais ne



**Figure 10. Latence pré-intégrative dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents.**

L'infection d'un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> quiescent conduit à une infection latente pré-intégrative. Le cycle de réplication du virus est bloqué à une étape précédant l'import nucléaire du génome viral et l'ADN viral est présent dans le cytoplasme. Si l'activation du lymphocyte se produit dans les 15 jours suivant l'infection, l'ADN viral s'intègre dans le génome cellulaire et l'infection devient productive.

peuvent pas infecter les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves qui n'expriment pas CCR5 (Blaak et al., 2000). Les virus de tropisme X4 peuvent infecter les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes qu'elles soient naïves ou mémoires grâce à l'expression de niveaux suffisants du corécepteur CXCR4 (Chun et al., 1997b). Cependant, l'infection des cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes n'est pas productive.

### 2.2.2. Latence pré-intégrative dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents

Lors de l'infection *in vitro* de cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes, la réplication du VIH-1 est bloquée à une étape précédant l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte (Bukrinsky et al., 1991; Stevenson et al., 1990; Zack et al., 1990). Après pénétration du virus dans un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> quiescent, l'ARN viral est très lentement rétrotranscrit (Zack et al., 1992). La lenteur du processus de transcription inverse est expliquée par la faible quantité de nucléotides dans ces cellules comparée aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés (Gao et al., 1993). L'ADN viral synthétisé par la réaction de transcription inverse est susceptible de s'intégrer (Pierson et al., 2002). Pourtant, l'ADN viral demeure cytoplasmique et l'intégration du génome viral ne peut être mise en évidence. Le cycle de réplication serait bloqué au niveau de l'import nucléaire du complexe de pré-intégration, en raison d'une faible quantité d'ATP (Bukrinsky et al., 1992).

Néanmoins, l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> infectées à l'état quiescent induit l'intégration du génome viral et la production de virus (Bukrinsky et al., 1991; Stevenson et al., 1990). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents contenant de l'ADN viral non intégré et capables de produire du virus après activation sont dans un état de latence pré-intégrative (**Figure 10**). Cependant, la production de particules virales nécessite une activation relativement rapidement après l'infection (jusqu'à deux semaines après l'infection). Cela suggère que le complexe de pré-intégration est instable. En effet, le complexe de pré-

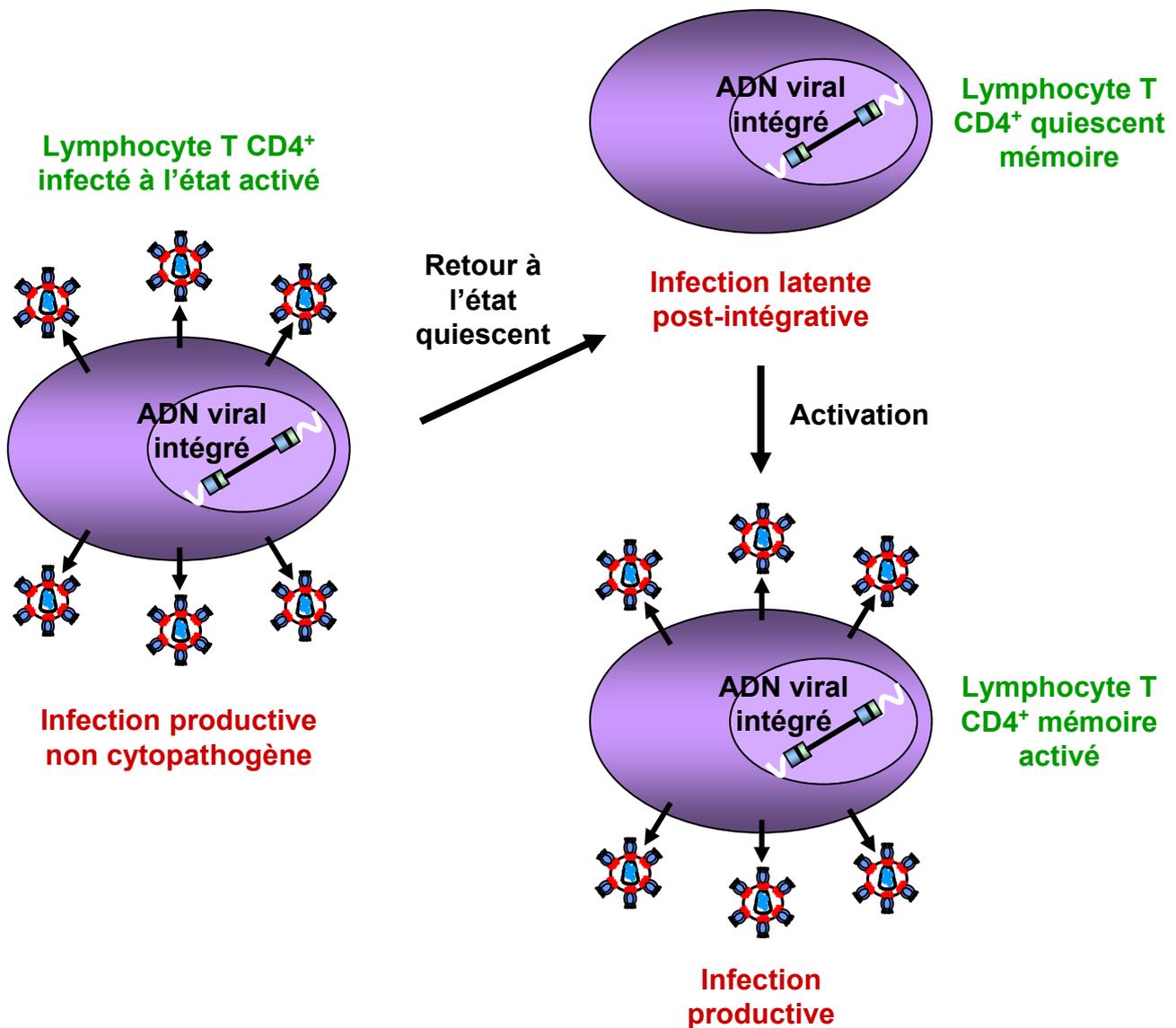
intégration est rapidement dégradé dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents (demi-vie de 1 jour) (Pierson et al., 2002; Swiggard et al., 2004; Zhou et al., 2005).

La présence d'ADN viral non intégré linéaire de taille génomique a été mise en évidence *in vivo* dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents isolés de patients infectés par le VIH-1 (Bukrinsky et al., 1991; Chun et al., 1997a). Il a été montré que le microenvironnement des cellules infectées influence la productivité de l'infection. Les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes infectées circulant dans l'organisme peuvent être activées par des cytokines et produire du virus (Unutmaz et al., 1999). Les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves présentes dans les tissus lymphoïdes ont la capacité de produire du virus en absence de stimulation antigénique (Eckstein et al., 2001). Le tissu lymphoïde fournirait les facteurs nécessaires à la réalisation d'un cycle viral complet dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents (Kinter et al., 2003).

Enfin, la majorité de l'ADN viral présent dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents est sous forme non intégrée, suggérant que la latence pré-intégrative est prépondérante chez les patients infectés par le VIH-1 (Blankson et al., 2000; Chun et al., 1997a).

### 2.2.3. Latence post-intégrative

Une seconde forme de latence, beaucoup plus stable que la latence pré-intégrative, a ensuite été mise en évidence *in vivo* (Chun et al., 1997a; Chun et al., 1995). L'utilisation de techniques de purification des cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes et de détection spécifique des formes intégrées d'ADN viral a permis de démontrer la présence de provirus intégrés dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents isolés de patients infectés par le VIH-1 (Chun et al., 1995). L'activation *ex vivo* de ces cellules induit la production de particules virales (Chun et al., 1995). Cependant, la quantité de cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes capables de produire du virus après activation est plus faible que la quantité de cellules T CD4<sup>+</sup> contenant un ADN viral intégré, suggérant que la majorité des molécules d'ADN viral intégré est défective (Chun et al., 1997a; Kieffer et al., 2005). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents contenant un ADN viral



**Figure 11. Latence post-intégrative dans les lymphocytes T CD4+ quiescents.**

Certains lymphocytes T CD4+ activés infectés par le VIH-1 ne succombent pas à l'effet cytopathogène de l'infection et sont susceptibles de retourner à un état quiescent pour devenir des cellules mémoires. Ces cellules contenant de l'ADN viral intégré sont dans un état de latence post-intégrative et constituent un réservoir à long terme pour le virus. L'activation de ces cellules permet la réalisation d'un cycle viral complet et une infection productive.

intégré dont l'expression est réactivable sont dans un état de latence post-intégrative (**Figure 11**).

Parmi les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes, une faible proportion contient de l'ADN viral intégré (de l'ordre de 0,05%) (Chun et al., 1997a). La majorité des cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes infectées dans un état de latence post-intégrative sont des cellules mémoires (Chun et al., 1997a). Comme l'intégration du génome viral semble avoir lieu dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés, il est supposé que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> contenant de l'ADN viral intégré ont été infectés lorsqu'ils étaient activés et qu'ils sont revenus à un état quiescent (**Figure 11**). Les mécanismes moléculaires de la latence post-intégrative seront détaillés dans le chapitre 5.

#### **2.2.4. Effet des thérapies antirétrovirales sur le réservoir de latence**

##### **2.2.4.1. *Persistance du réservoir de latence chez les patients sous HAART***

Trois équipes ont démontré la présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents infectés de façon latente chez des patients traités par HAART et dont la charge virale plasmatique était indétectable depuis de longues périodes (Chun et al., 1997c; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997). Cela suggère que le réservoir de latence est peu affecté par les traitements antirétroviraux. Après plusieurs mois de traitement, la forme de latence qui persiste dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents est post-intégrative (Chun et al., 1997c; Finzi et al., 1997).

La détection du réservoir de latence chez des patients traités précocement après infection suggère que sa formation a lieu très rapidement après l'infection (Chun et al., 1998). Enfin, la fréquence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents infectés de façon latente ne semble pas diminuer avec le temps de traitement par HAART (Finzi et al., 1997). Il semble donc que le réservoir de latence soit capable de persister à long terme chez les patients infectés traités par HAART.

#### 2.2.4.2. *Demi-vie du réservoir de latence*

La stabilité du réservoir de latence a été ensuite confirmée (pour revue (Siliciano and Siliciano, 2004)). Chez des patients traités et dont la charge virale plasmatique demeurait indétectable, aucune diminution significative de la proportion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés de façon latente n'a été observée (Finzi et al., 1999). Les analyses statistiques ont permis d'évaluer la demi-vie du réservoir de latence à 43,9 mois. Le déclin du réservoir de latence est donc beaucoup plus lent que celui du compartiment cellulaire responsable de la deuxième phase de déclin de la réplication virale (1/2 vie de 2 semaines) (**Figure 9**).

Néanmoins, il est apparu qu'au cours du traitement, la vitesse de déclin du réservoir de latence était variable d'un patient à l'autre (Ramratnam et al., 2000; Zhang et al., 1999a). Il a ainsi été montré que la demi-vie du réservoir de latence était d'environ 6 mois chez des patients traités pendant l'infection primaire ou ayant une très bonne suppression de la charge virale sous HAART (Ramratnam et al., 2000; Zhang et al., 1999a). Au contraire, chez des patients ayant subi des résurgences transitoires de la charge virale plasmatique au cours de leur traitement, la vitesse de déclin du réservoir de latence est moins rapide (Ramratnam et al., 2000).

Cependant, la demi-vie extrêmement longue du réservoir de latence a été confirmée chez des patients traités pendant l'infection primaire et dont la virémie est indétectable depuis 7 ans (Siliciano et al., 2003). En estimant la taille du réservoir de latence à 10<sup>6</sup> cellules, et en considérant que la demi-vie de ce réservoir est de 44,2 mois, alors il faudrait 73,4 ans de traitement pour éradiquer l'infection (Finzi et al., 1999; Siliciano et al., 2003). L'importante stabilité du réservoir de latence constitué par les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires permet au VIH-1 de persister à très long terme chez les patients traités par HAART.

### 2.2.4.3. *Résurgence virale lors des interruptions de traitement*

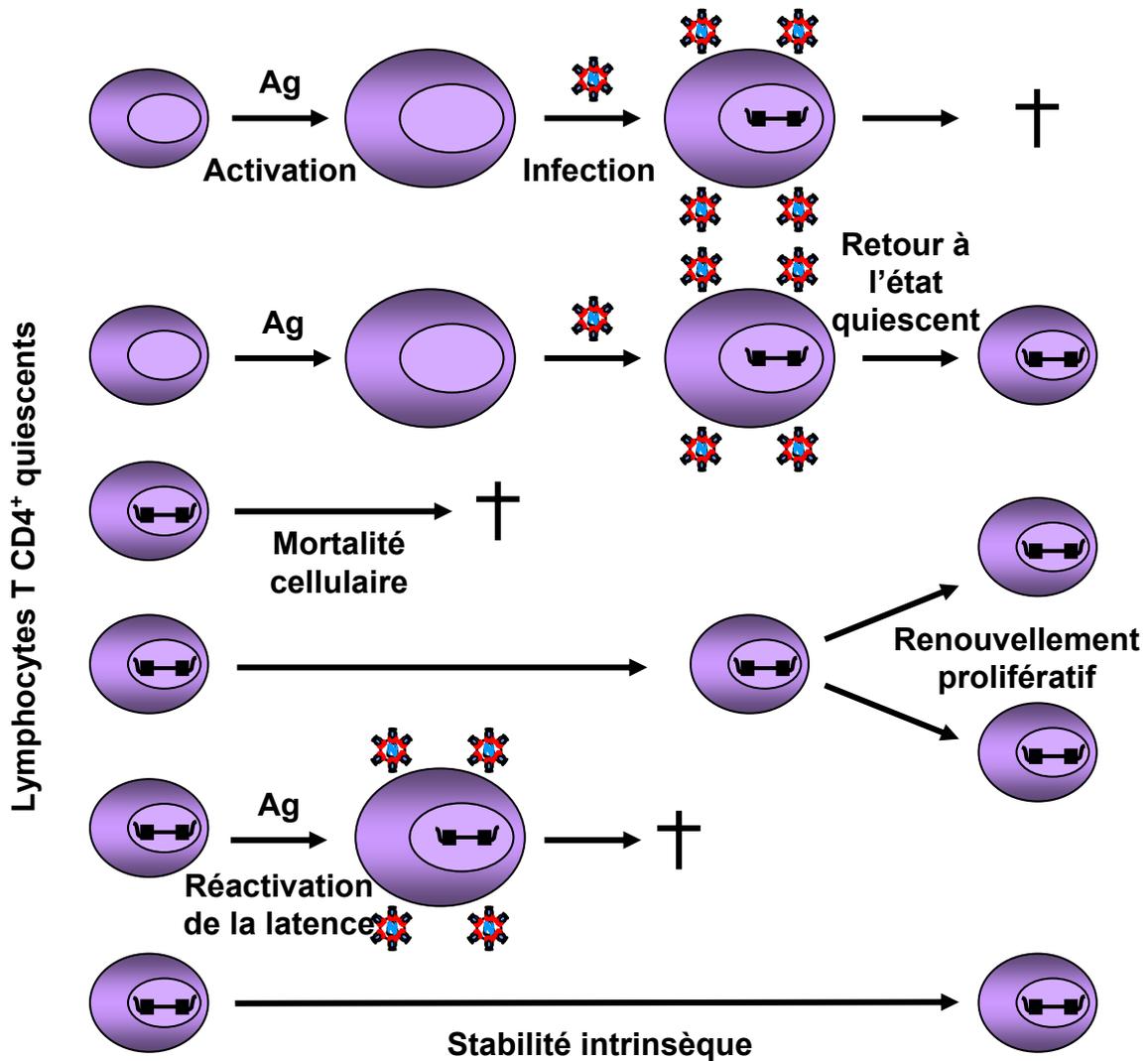
L'interruption du traitement anti-VIH-1 provoque une résurgence rapide de la charge virale plasmatique dans les 2 semaines suivant l'arrêt du traitement (Chun et al., 1999a; Davey et al., 1999). La résurgence virale observée en dépit d'une suppression durable de la charge virale plasmatique sous traitement confirme la persistance du VIH-1 dans des réservoirs cellulaires. Pour déterminer si le réservoir de latence est responsable de la résurgence virale, les séquences des virus obtenus lors de la résurgence ont été comparées à celles des virus isolés des cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes durant le traitement (Chun et al., 2000; Zhang et al., 2000). Les résultats ont montré que la reprise de la réplication virale pouvait provenir en partie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents infectés constituant le réservoir de latence. Ces travaux suggèrent que le réservoir de latence est effectivement réactivable *in vivo*.

Toutefois, le réservoir de latence ne semble pas entièrement responsable du rebond de la charge virale plasmatique au cours des interruptions de traitement (Chun et al., 2000; Zhang et al., 2000). En effet, la rapidité de la résurgence virale plasmatique observée lors de l'arrêt du traitement ne correspond pas à l'estimation de la capacité de production du réservoir de latence (Chun et al., 2000). Cela suggère que le rebond de la réplication virale peut provenir d'autres réservoirs viraux encore non caractérisés.

### 2.2.5. **Origine de la stabilité du réservoir de latence**

Deux hypothèses permettent d'expliquer la stabilité du réservoir de latence : la biologie des cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires et la réplication virale résiduelle sous traitement (pour revue (Persaud et al., 2003)).

La stabilité du réservoir de latence est une conséquence directe de la longue durée de vie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents. En effet, les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires se divisent tous les 5-6 mois. D'autre part, le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents est maintenu grâce à



**Figure 12. Etablissement et maintien du réservoir de latence post-intégratif.**

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents mémoires contenant de l'ADN viral intégré sont dans un état de latence post-intégrative. Le VIH-1 peut persister à long terme en dépit des traitements antiviraux grâce à deux processus : la stabilité intrinsèque et le renouvellement prolifératif des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents infectés et/ou le maintien d'une réplication résiduelle faible. D'après Persaud et al., 2003.

un processus de prolifération indépendant de la présence d'antigènes afin d'assurer une persistance de la mémoire immunitaire. Ainsi, la stabilité intrinsèque des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents et leur renouvellement prolifératif permettraient au VIH-1 de persister à long terme grâce à l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire (**Figure 12**).

L'autre hypothèse est que le traitement par HAART n'inhibe pas complètement la réplication du VIH-1 et que cette réplication résiduelle réapprovisionne continuellement le réservoir de latence, le rendant très stable en apparence. L'existence d'une réplication virale résiduelle chez des patients traités par HAART et ayant une charge virale plasmatique indétectable a été démontrée grâce à des techniques de détection de l'ARN viral plus sensibles (Dornadula et al., 1999; Furtado et al., 1999). D'autre part, étant donné le caractère labile de la latence pré-intégrative, la détection de formes non intégrées d'ADN viral suggère une infection récente (Sharkey et al., 2005; Sharkey et al., 2000). L'ensemble de ces travaux suggère que la réplication virale n'est pas entièrement inhibée par les traitements antirétroviraux. La réactivation des cellules infectées de façon latente pourrait expliquer en partie la réplication résiduelle sous traitement, et l'infection productive de nouvelles cellules pourrait permettre de réapprovisionner le réservoir de latence (**Figure 12**).

Cependant, les analyses phylogénétiques des quasi-espèces virales présentes dans le réservoir de latence ont montré une stabilité intrinsèque (Gunthard et al., 1999; Ruff et al., 2002; Strain et al., 2003). En effet, le réservoir de latence se comporte comme une archive de toutes les quasi-espèces virales générées au cours de l'infection (Lambotte et al., 2004). Les virus résistants aux antirétroviraux détectés dans le réservoir de latence correspondent à des virus sélectionnés par un traitement ne permettant pas de contrôler la charge virale plasmatique. Les virus sauvages et sensibles aux antirétroviraux peuvent également persister dans le réservoir de latence. La production continue de virus sensible pendant plusieurs

années sans qu'il y ait accumulation de résistance démontre l'extrême stabilité du réservoir de latence.

### **2.2.6. Approches pour éliminer le réservoir de latence**

Etant donné la grande stabilité du réservoir de latence, il est peu probable que l'éradication du virus soit possible avec les traitements antirétroviraux actuels. Plusieurs stratégies pour éliminer le réservoir de latence ont donc été proposées (pour revue (Hamer, 2004)).

#### **2.2.6.1. Intensification du traitement par HAART**

Une des approches est l'intensification du traitement par HAART. Si la réplication virale résiduelle réapprovisionne le réservoir de latence, le rendant stable en apparence, alors l'intensification du traitement pour inhiber complètement la réplication virale pourrait permettre un déclin plus rapide du réservoir de latence (Ramratnam et al., 2000). Bien que l'intensification du traitement diminue la demi-vie du réservoir de latence de 31 à 10 mois, la réplication virale résiduelle n'est pas totalement inhibée (Ramratnam et al., 2004). De plus, la toxicité du traitement rend l'éradication de l'infection uniquement par cette approche inconcevable.

#### **2.2.6.2. Activation des cellules T**

Une autre stratégie consiste à activer les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes infectées de façon latente pour purger le virus du réservoir de latence. L'infection productive de nouvelles cellules par les virus produits lors de l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes infectées serait inhibée en présence des molécules antirétrovirales.

Une des approches consiste à utiliser des cytokines comme l'IL-2 pour activer l'expression des gènes viraux dans les cellules infectées de façon latente (Chun et al., 1999b). Récemment, il a été montré que l'IL-7, en adjonction du traitement par HAART, permet une réplication virale plus efficace que l'IL-2 dans les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes de patients

infectés (Wang et al., 2005). Cette cytokine pourrait donc être utilisée pour purger le réservoir de latence en association avec d'autres molécules.

Une autre approche consiste à utiliser des ester de phorbol. Par exemple, la prostratine est capable à la fois d'inhiber l'infection par le VIH-1 *de novo* et d'induire l'expression virale des provirus latents (Biancotto et al., 2004; Kulkosky et al., 2001). La prostratine est donc un bon candidat pour permettre l'élimination des réservoirs viraux dans lesquels le VIH-1 persiste.

Enfin, l'administration d'inhibiteurs d'histone déacétylases permet d'induire l'expression des provirus latents dans les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes de patients infectés sans les activer et sans augmenter l'infection *de novo* (Demonte et al., 2004; Ylisastigui et al., 2004).

### **2.2.6.3. Approches immunologiques**

Des stratégies améliorant les réponses immunitaires contre le VIH-1 pourraient permettre de contrôler la réplication des virus émergeant du réservoir de latence. Dans ce but, des essais d'interruptions programmées de traitement (STI, « Structured Treatment Interruption ») ont été menés (pour revue (Liszewicz and Lori, 2002)). D'une part, l'immunité spécifique contre le VIH-1 diminuant avec la durée du traitement, la réplication virale provoquée par les STI pourrait stimuler la réponse immunitaire. D'autre part, les STI permettent de diminuer la contrainte et la toxicité du traitement. De plus, le traitement précoce de l'infection permettrait le développement d'une forte réponse immunitaire cellulaire contre le VIH-1.

Cependant, l'élaboration de nouvelles stratégies visant à éliminer le VIH-1 de l'organisme doit prendre en compte l'existence d'autres réservoirs viraux.

## **2.3. Autres réservoirs viraux**

*In vivo*, l'infection productive par le VIH-1 est observée dans les cellules exprimant la molécule CD4 : les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les macrophages. Cependant, d'autres réservoirs

cellulaires ou anatomiques du VIH-1 peuvent être envisagés (pour revue (Blankson et al., 2002)). Nous ne décrivons ici que les réservoirs cellulaires.

### 2.3.1. Cellules T CD8<sup>+</sup>

Quelques cas d'infection de cellules T CD8<sup>+</sup> ont été reportés, notamment chez des patients en phase SIDA. *In vitro*, la costimulation des cellules T CD8<sup>+</sup> induit l'expression de CD4 et rend les cellules susceptibles à l'infection par le VIH-1 (Flamand et al., 1998; Kitchen et al., 1998). L'infection des cellules T CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> altère la réponse cytotoxique et pourrait contribuer à l'immunodéficience (Kitchen et al., 2004). L'infection des cellules T CD8<sup>+</sup> par le VIH-1 pourrait fournir un nouveau réservoir pour le virus.

### 2.3.2. Cellules B

La stimulation des cellules B par CD40L induit l'expression de CD4 et CXCR4 et permet l'infection par le VIH-1 *ex vivo* (Moir et al., 1999). Les cellules B peuvent également fixer à leur surface des particules virales opsonisées par le complément *via* la molécule CD21 et les transmettre aux cellules T CD4<sup>+</sup> activées (Moir et al., 2000). Les cellules B peuvent agir d'une façon similaire aux cellules dendritiques folliculaires et servir de réservoir de capture pour le VIH-1.

### 2.3.3. Cellules NK

Une sous-population de cellules Natural Killer NK CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> exprime les récepteurs et corécepteurs d'entrée du VIH-1. Ces cellules peuvent être infectées de façon productive par le VIH-1 *in vitro* (Valentin and Pavlakis, 2003; Valentin et al., 2002). L'analyse des cellules NK CD4<sup>+</sup> de patients infectés par le VIH-1 a montré la présence d'ADN viral et de virus compétents pour la réplication après activation *in vitro*. La détection d'ADN viral dans les cellules NK de patients traités par HAART et ayant une charge virale plasmatique

indétectable depuis plusieurs années suggère que ces cellules peuvent se comporter comme un réservoir de latence pour le VIH-1.

#### **2.3.4. Monocytes / Macrophages**

Les macrophages représentent un réservoir de persistance pour le VIH-1. Les macrophages sont moins susceptibles aux effets cytopathogènes de l'infection par le VIH-1 et produisent continuellement de nouvelles particules virales (Aquaro et al., 2002). Les macrophages jouent un rôle fondamental dans la dissémination du virus en activant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et en favorisant leur infection (Swingler et al., 2003) et en agissant comme un « cheval de Troie » pour transmettre le virus dans le système nerveux central (Herbein et al., 2002).

Les monocytes sont plus résistants à l'infection par le VIH-1 que les macrophages en raison d'un blocage de la réplication du VIH-1 au niveau de l'étape de transcription inverse (Triques and Stevenson, 2004). Cependant, le blocage de la réplication n'est pas absolu et une réplication à faible niveau est observée dans les monocytes isolés de patients infectés (Sonza et al., 2001; Zhu et al., 2002). De plus, les monocytes infectés de façon chronique persistent chez les patients sous HAART ayant une charge virale indétectable. Cependant, étant donné le taux de renouvellement physiologique de ces cellules, la détection du VIH-1 dans les monocytes reflète plus probablement l'infection récente de ces cellules par les virus produits à bas niveau chez les patients sous HAART (pour revue (Crowe et al., 2003)).

#### **2.3.5. Cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques (DC) se comportent comme un réservoir de capture pour le VIH-1. Les DC peuvent fixer les particules virales *via* par l'interaction de la gp120 avec la lectine de type C DC-SIGN (« Dendritic Cell Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin ») et les transmettre aux cellules T CD4<sup>+</sup> lors d'une réponse immunitaire (Geijtenbeek et al., 2000). Les virions capturés par les DC sont internalisés dans un compartiment non lysosomal et

retiennent leur capacité à infecter des cellules T en *trans* (Kwon et al., 2002). La transmission à long terme nécessite une réplication du virus dans les DC (Nobile et al., 2005). Les DC jouent donc un rôle fondamental dans la dissémination du virus dans les tissus lymphoïdes secondaires. Quelques types de DC peuvent être infectées de façon productive par le VIH-1 (Popov et al., 2005). Cependant, ces cellules ne semblent pas être un réservoir pour le VIH-1 chez les patients sous HAART (Otero et al., 2003).

L'existence de réservoirs cellulaires du VIH-1 constitue donc un obstacle majeur à l'éradication de l'infection. Le réservoir de latence chez les patients infectés sous trithérapie est constitué par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents. La persistance du VIH-1 à long terme est due à l'extraordinaire stabilité du réservoir de latence, à la réplication virale résiduelle sous traitement, et à l'existence d'autres réservoirs viraux.

### **3. INTERACTIONS ENTRE LE VIH-1 ET LA CELLULE HÔTE**

La complexité de la persistance du VIH-1 dans les réservoirs cellulaires suggère que le virus établit une relation étroite avec sa cellule hôte. En effet, les différentes phases du cycle viral font l'objet de nombreuses interactions entre les protéines virales et cellulaires (pour revues (Freed, 2004; Greene and Peterlin, 2002; Trkola, 2004)).

#### **3.1. Entrée virale**

L'étape d'entrée constitue la première étape du cycle de réplication virale. Le processus d'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles est dépendant des glycoprotéines d'enveloppe virale qui interagissent de façon séquentielle avec des récepteurs cellulaires spécifiques (pour revue (Clapham and McKnight, 2002)).

### **3.1.1. Déterminants cellulaires et viraux de l'entrée virale**

#### ***3.1.1.1. Récepteurs cellulaires du VIH-1***

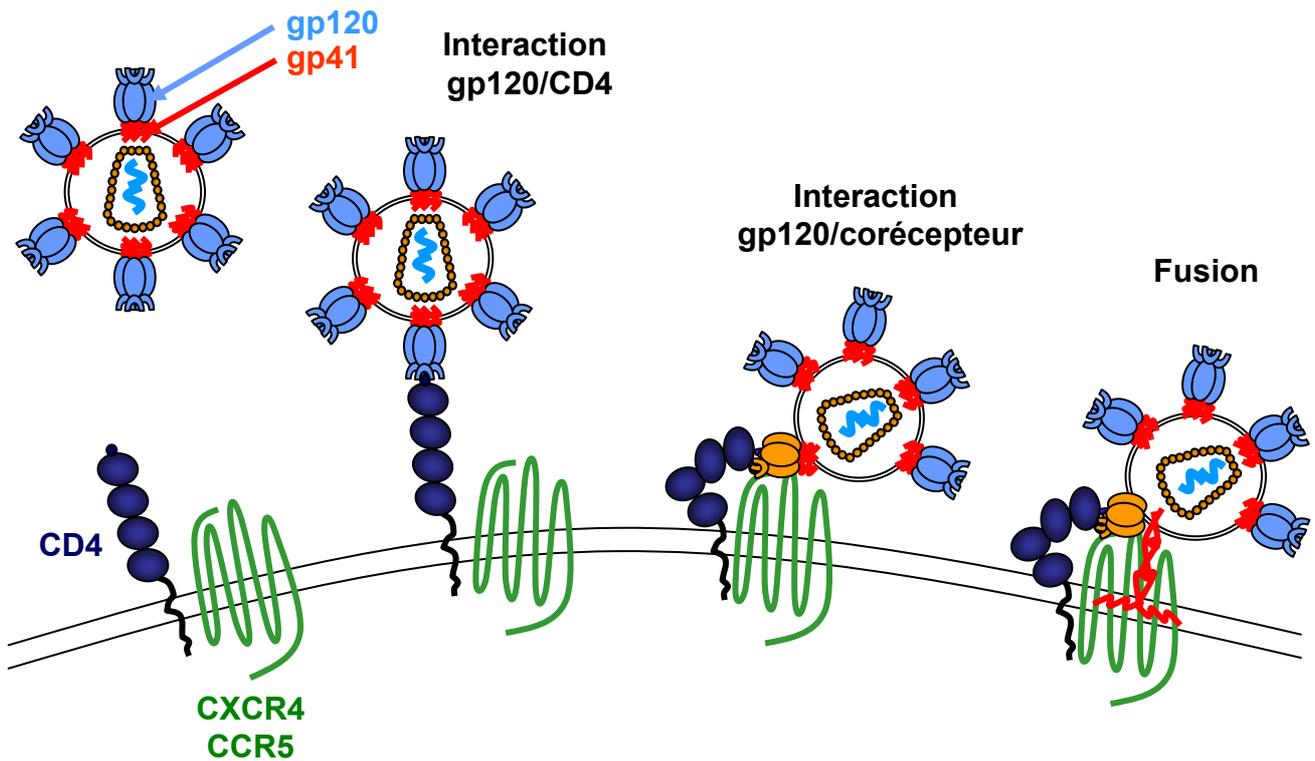
Le VIH-1 utilise successivement deux récepteurs cellulaires lors de son entrée : la molécule CD4 et un corécepteur appartenant à la famille des récepteurs aux chimiokines, CXCR4 et/ou CCR5. L'utilisation de l'un ou l'autre de ces corécepteurs définit le tropisme viral (cf. § 1.4).

#### ***3.1.1.2. Glycoprotéines d'enveloppe virale***

Les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 sont composées de deux sous-unités provenant du clivage du précurseur gp160 : la glycoprotéine extramembranaire gp120 et la glycoprotéine transmembranaire gp41. Les deux sous-unités gp120 et gp41 sont maintenues assemblées par des interactions non covalentes et sont présentes sous forme de trimères à la surface des virions. La gp120 est responsable de l'attachement du virus aux cellules cibles en interagissant avec les récepteurs cellulaires et détermine ainsi le tropisme du VIH-1. La gp41 est responsable de la fusion membranaire entre le virus et les cellules cibles.

#### ***3.1.1.3. Rôle des radeaux lipidiques dans l'entrée du VIH-1***

Les radeaux lipidiques (« lipid rafts ») correspondent à des microdomaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides. Plusieurs travaux montrent l'implication des radeaux lipidiques dans le processus d'entrée du VIH-1 (pour revue (Chazal and Gerlier, 2003)). La fixation du virus sur la cellule cible entraîne le regroupement de CD4, CXCR4 et CCR5 dans des radeaux lipidiques (Popik et al., 2002). L'utilisation des radeaux lipidiques dans l'entrée du VIH-1 permettrait donc de recruter et concentrer les récepteurs du virus ou créer un environnement compatible avec la fusion membranaire. Cependant, le rôle des radeaux lipidiques dans l'entrée du VIH-1 est controversée (Percherancier et al., 2003; Popik and Alce, 2004).



**Figure 13. Mécanisme d'entrée du VIH-1.**

L'attachement du virus à la surface de la cellule cible dépend de l'interaction entre la gp120 et la molécule CD4. Cette liaison entraîne un changement conformationnel de la gp120 (représenté en orange) conduisant au démasquage du site de liaison au corécepteur. Le complexe CD4/gp120/corécepteur permet alors de démasquer le peptide de fusion de la gp41. L'ancrage du peptide de fusion dans la membrane de la cellule cible conduit à la fusion des membranes virale et cellulaire et à la libération du « core » viral dans le cytoplasme cellulaire.

### 3.1.2. Mécanisme d'entrée du VIH-1

Le mécanisme d'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes (**Figure 13**).

#### 3.1.2.1. *Attachement*

L'attachement des particules virales à la surface de la cellule cible s'effectue par l'intermédiaire des glycoprotéines d'enveloppe et de molécules cellulaires différentes des récepteurs. L'existence de ces facteurs d'attachement pourrait permettre de concentrer le virus à la surface cellulaire avant l'interaction spécifique avec les récepteurs cellulaires (Clapham and McKnight, 2002). A la surface des cellules dendritiques, la fixation des particules virales à DC-SIGN favorise l'infection en *trans* des cellules T CD4<sup>+</sup> (Geijtenbeek et al., 2000).

#### 3.1.2.2. *Interaction gp120-CD4/corécepteurs*

L'interaction spécifique de la gp120 avec le récepteur cellulaire CD4 constitue la première étape nécessaire à l'infection. Cette interaction va induire un changement de conformation de la gp120 permettant l'exposition du site de fixation aux corécepteurs (**Figure 13**). L'interaction de gp120/CD4 avec les corécepteurs permet de rapprocher les membranes virale et cellulaire.

#### 3.1.2.3. *Fusion membranaire*

Les interactions de la gp120 avec ses récepteurs cellulaires déclenchent l'activation de la fusion (pour revue (Eckert and Kim, 2001)). La gp41 jusqu'alors enfouie est démasquée et adopte une conformation active fusogène. Le peptide de fusion de la gp41 s'ancre alors dans la membrane de la cellule et conduit à la fusion des membranes virale et cellulaire, libérant ainsi la capsid virale dans le cytoplasme (**Figure 13**).

Le processus de fusion est indépendant du pH (Stein et al., 1987). En revanche, il a été montré que la majorité des particules virales se fixant à la surface cellulaire pénétraient dans la cellule par endocytose (Marechal et al., 1998). Il existe un équilibre entre ces deux voies

d'entrée puisque l'inhibition d'une des voies augmente l'entrée des particules virales par l'autre mécanisme (Schaeffer et al., 2004). Cependant les particules pénétrant par endocytose sont dégradées par le protéasome et ne permettent pas une infection productive (Schwartz et al., 1998). De ce fait, l'inhibition de la dégradation par les endosomes/lysosomes augmente l'infectivité du virus (Fredericksen et al., 2002).

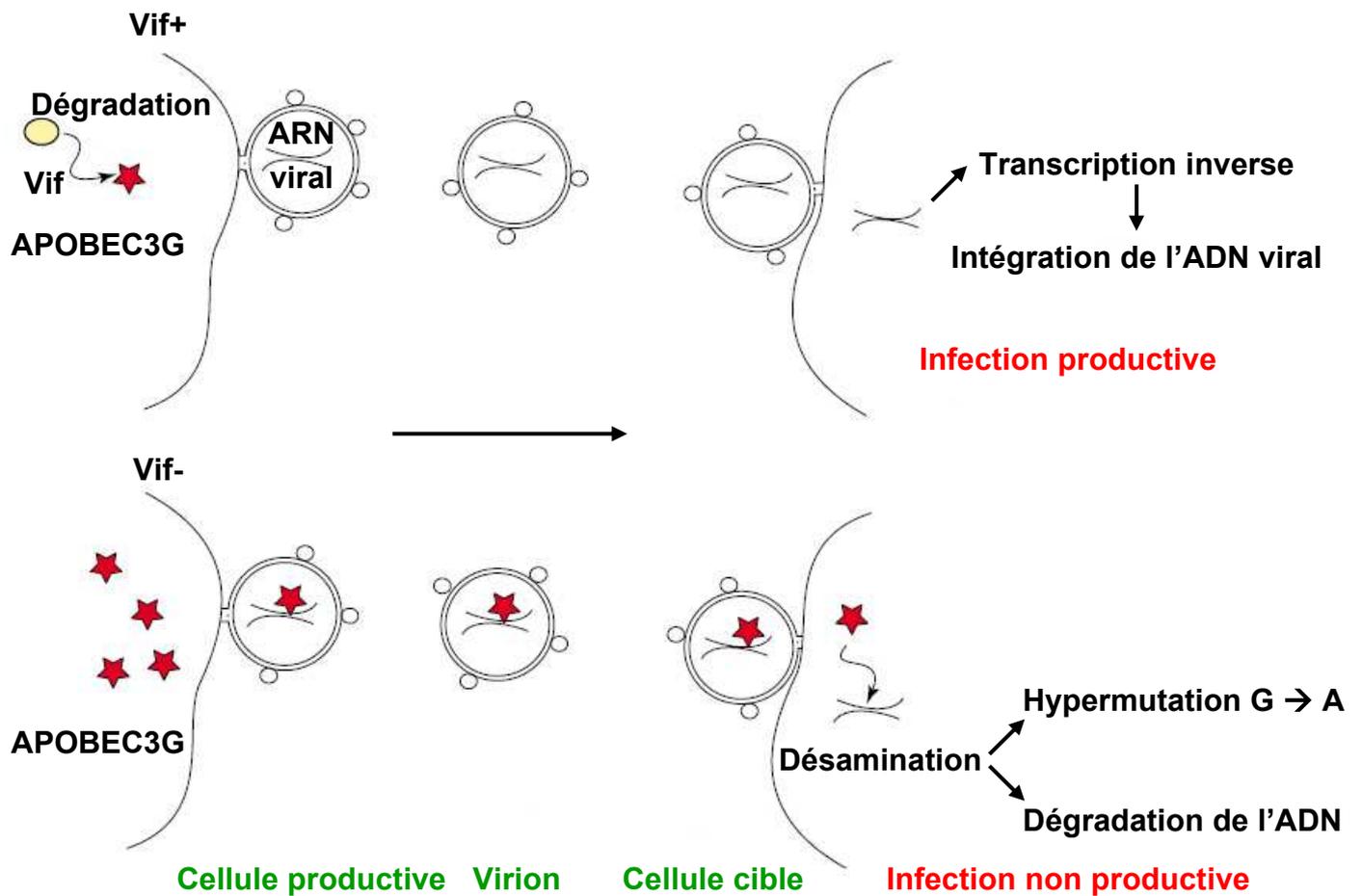
## **3.2. Transcription inverse**

### **3.2.1. Complexe de transcription inverse ou RTC**

Après pénétration dans le cytoplasme de la cellule, le « core » viral est « déshabillé ». Ce processus encore mal connu semble impliquer la phosphorylation de la protéine de matrice MA par une kinase MAPK (« Mitogen-Activated Protein Kinase ») (Cartier et al., 1999) et l'action de la cyclophiline A (Braaten et al., 1996) et des protéines virales Nef (Schaeffer et al., 2001) et Vif (Ohagen and Gabuzda, 2000).

La transcription inverse se déroule au sein du RTC, composé de l'ARN viral, des protéines virales RT, IN, NC, MA et Vpr, d'un ARNt Lys et de diverses protéines cellulaires (Fassati and Goff, 2001). L'interaction du RTC avec les microfilaments d'actine, médiée par la protéine MA phosphorylée est nécessaire à une transcription inverse efficace (Bukrinskaya et al., 1998).

La réaction de transcription inverse est catalysée par la RT qui est une ADN polymérase ARN et ADN dépendante possédant une activité RNase H. La transcription inverse de l'ARN viral conduit à la synthèse d'un ADN double brin linéaire encadré par les séquences répétées LTR et présentant une discontinuité du brin positif d'ADN ainsi qu'un triplex d'ADN (Flap) situés au centre du génome viral (pour revue (Freed, 2001)).



**Figure 14. Interactions des protéines Vif et APOBEC3G.**

Dans des cellules productrices non permissives, la protéine Vif contenue dans les virions (Vif+) dégrade APOBEC3G. La protéine Vif empêche ainsi l'incorporation d'APOBEC3G dans les nouveaux virions et permet une infection productive de la cellule cible. En absence de Vif (Vif-), les nouveaux virions produits encapsident APOBEC3G, ce qui entraîne la désamination de l'ADN lors de la transcription inverse. Ceci a pour effet une dégradation de l'ADN et une hypermutation des résidus G en A et entraîne une infection non productive. D'après Freed, 2004.

### 3.2.2. Rôle de la protéine virale Vif dans la transcription inverse

La protéine virale auxiliaire Vif joue un rôle dans les étapes précoces du cycle de réplication du VIH-1. La protéine Vif est incorporée dans les virions et est nécessaire à la synthèse de l'ADN proviral. Les virus  $\Delta$ -Vif produits par des cellules non permissives sont peu infectieux et ce quelque soit le type de cellules cibles infectées. En revanche, si les particules virales sont produites par des cellules permissives, les virions sont infectieux qu'ils codent ou non pour la protéine Vif. Il existerait donc un facteur antiviral présent dans les cellules non permissives qui serait inhibé par la protéine Vif, et ce facteur serait absent dans les cellules permissives. Des études récentes ont permis d'expliquer ces observations (pour revues (Navarro and Landau, 2004; Rose et al., 2004)).

La protéine Vif interagit avec la protéine cellulaire CEM15/APOBEC3G (« Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme, Catalytic polypeptide-like 3G ») qui appartient à la famille des cytidines désaminases (Sheehy et al., 2002). L'incorporation d'APOBEC3G dans les particules virales conduit à la conversion des résidus cytidines du brin d'ADN négatif en uridines durant la transcription inverse dans la cellule cible. Cela entraîne la dégradation des molécules d'ADN néosynthétisées par les enzymes de réparation de la cellule hôte et l'hypermutation de G vers A des molécules d'ADN intégrées ayant échappées à la dégradation (Mangeat et al., 2003). Le taux très élevé de mutations empêche alors la synthèse de protéines virales fonctionnelles. La protéine Vif induit la dégradation de APOBEC3G par le protéasome (Marin et al., 2003) et empêche ainsi son incorporation dans les particules virales et/ou bloque son activité (Mariani et al., 2003) (**Figure 14**).

### 3.2.3. Rôle de la protéine cellulaire cyclophiline A dans les étapes précoces

La protéine cellulaire cyclophiline A (CypA) est incorporée dans les virions *via* son interaction avec la protéine de capsid CA (Franke et al., 1994) et joue un rôle dans les étapes précoces du cycle viral, avant la transcription inverse (Braaten et al., 1996). Il a été montré

que la CypA module la sensibilité du VIH-1 aux facteurs de restriction de l'hôte (Towers et al., 2003). Le facteur Ref1 (« Restriction factor 1 ») inhibe les infections rétrovirales dans les cellules humaines et le facteur Lv1 (« Lentivirus susceptibility 1 ») inhibe les infections par les lentivirus dans certaines lignées cellulaires de primates non humains (pour revue (Bieniasz, 2003)). La CypA protège la capsid virale du facteur de restriction Ref1 dans les cellules humaines alors que l'interaction entre la CypA et la CA sensibilise le VIH-1 à la restriction par Lv1 dans les cellules de primates non humains (Towers et al., 2003).

### **3.3.Import nucléaire du complexe de pré-intégration**

Une fois la transcription inverse terminée, l'ADN viral synthétisé reste associé à un complexe protéique de haut poids moléculaire appelé complexe de pré-intégration (PIC) et composé des protéines virales RT, IN, MA, Vpr et de diverses protéines cellulaires (Miller et al., 1997).

Le PIC est acheminé vers le noyau en utilisant le cytosquelette de la cellule. Plusieurs études ont montré des interactions spécifiques entre les protéines virales et des composants du cytosquelette. Notamment, l'intégrase interagit avec des protéines associées aux microtubules et la nucléocapside interagit avec l'actine (pour revue (Dvorin and Malim, 2003)).

Pour que l'intégration puisse avoir lieu, le PIC doit pénétrer dans le noyau de la cellule hôte (pour revue (Piller et al., 2003)). L'import nucléaire de l'ADN viral des rétrovirus à propriétés oncogènes nécessite la destruction de l'enveloppe nucléaire qui a lieu au cours de la mitose. Au contraire et comme pour les autres lentivirus, l'intégration de l'ADN du VIH-1 peut avoir lieu en absence de division cellulaire (Bukrinsky et al., 1992). Cette propriété confère au VIH-1 la capacité d'infecter des cellules non prolifératives comme les macrophages et les lymphocytes T quiescents.

Le diamètre du PIC étant deux fois supérieur à celui du pore nucléaire, la diffusion passive du PIC à travers le pore nucléaire est exclue. D'ailleurs, l'import nucléaire de l'ADN du VIH-1 est dépendant de la présence d'ATP indiquant qu'il s'agit bien d'un processus actif (Bukrinsky et al., 1992). L'import nucléaire implique le transport de protéines possédant un signal de localisation nucléaire ou NLS (« Nuclear Localization Signal ») par des protéines appelée importines qui interagissent ensuite avec des composants du pore nucléaire pour permettre l'import de la protéine.

Plusieurs déterminants viraux ont été proposés pour favoriser l'import nucléaire des PIC. Cependant, les mécanismes d'import nucléaire sont sujets à de nombreuses controverses. La protéine MA favorise l'import nucléaire par l'intermédiaire de deux séquences de localisation nucléaire (Bukrinsky et al., 1993). D'autre part, l'interaction directe de Vpr avec des composants des pores nucléaires faciliterait également l'import nucléaire du PIC (Popov et al., 1998). Cependant, les rôles des protéines MA et Vpr dans l'import nucléaire sont largement controversés (pour revue (Sherman and Greene, 2002)). Plusieurs séquences putatives de localisation nucléaire ont été également été mises en évidence dans l'intégrase (Gallay et al., 1997). Enfin, il a également été suggéré que le triplex au centre de l'ADN viral, ou Flap, soit nécessaire à l'import nucléaire (Zennou et al., 2000). Le Flap pourrait permettre à l'ADN d'adopter une conformation favorable à sa translocation à travers le pore nucléaire. Cependant, les rôles de l'IN et du Flap dans l'import nucléaire ont également été controversés (Dvorin et al., 2002).

Ces protéines virales peuvent participer à l'import nucléaire du PIC de manière plus ou moins synergique en fonction du type cellulaire infecté. En conclusion, il n'existe donc pas de consensus quant aux processus impliqués dans l'import nucléaire.

### 3.4. Intégration

L'intégration de l'ADN viral double brin linéaire issu de la transcription inverse dans l'ADN cellulaire est catalysée par l'intégrase (pour revue (Freed, 2001)). Alors que des complexes de pré-intégration isolés à partir de cellules infectées sont capables d'intégrer les deux extrémités de l'ADN viral en même temps *in vitro* dans un ADN cible, en reproduisant fidèlement le produit de l'intégration *in vivo*, la réaction catalysée par l'intégrase seule *in vitro* donne lieu en majorité à l'intégration d'une seule extrémité de l'ADN viral. Cette observation a conduit à faire l'hypothèse que d'autres protéines seraient nécessaires à la réalisation d'une réaction d'intégration concertée *in vivo*. La recherche de facteurs cellulaires a permis d'identifier plusieurs protéines susceptibles de favoriser l'intégration.

Le facteur INI1 (« Intégrase Interactor 1 »), qui est une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, interagit avec l'IN (Kalpana et al., 1994). INI1 est capable de stimuler le transfert de brin *in vitro* et de faciliter l'intégration dans l'ADN cellulaire en remodelant la chromatine au site d'intégration (Kalpana et al., 1994).

Une autre protéine cellulaire HMG I(Y) (« High Mobility Group I(Y) »), une protéine non-histone de la chromatine, est capable de compléter l'activité d'intégration de PIC non fonctionnels (Farnet and Bushman, 1997), ainsi que de stimuler l'intégration concertée de l'ADN viral par l'intégrase, *in vitro* (Hindmarsh et al., 1999). De plus, HMG I(Y) est associée aux PIC (Farnet and Bushman, 1997). L'action de HMG I(Y) sur le processus d'intégration serait en fait médiée par sa capacité à se lier aux LTR et à condenser l'ADN viral pour qu'il soit dans une conformation favorisant l'assemblage d'un complexe intégrase-ADN viral actif (Hindmarsh et al., 1999).

Une protéine cellulaire qui protège l'ADN viral de l'auto-intégration, c'est à dire de l'intégration d'un ADN viral dans lui-même, a été isolée ; il s'agit du facteur BAF (« Barrier to Autointegration Factor ») (Lee and Craigie, 1998). Comme HMG I(Y), BAF est capable de

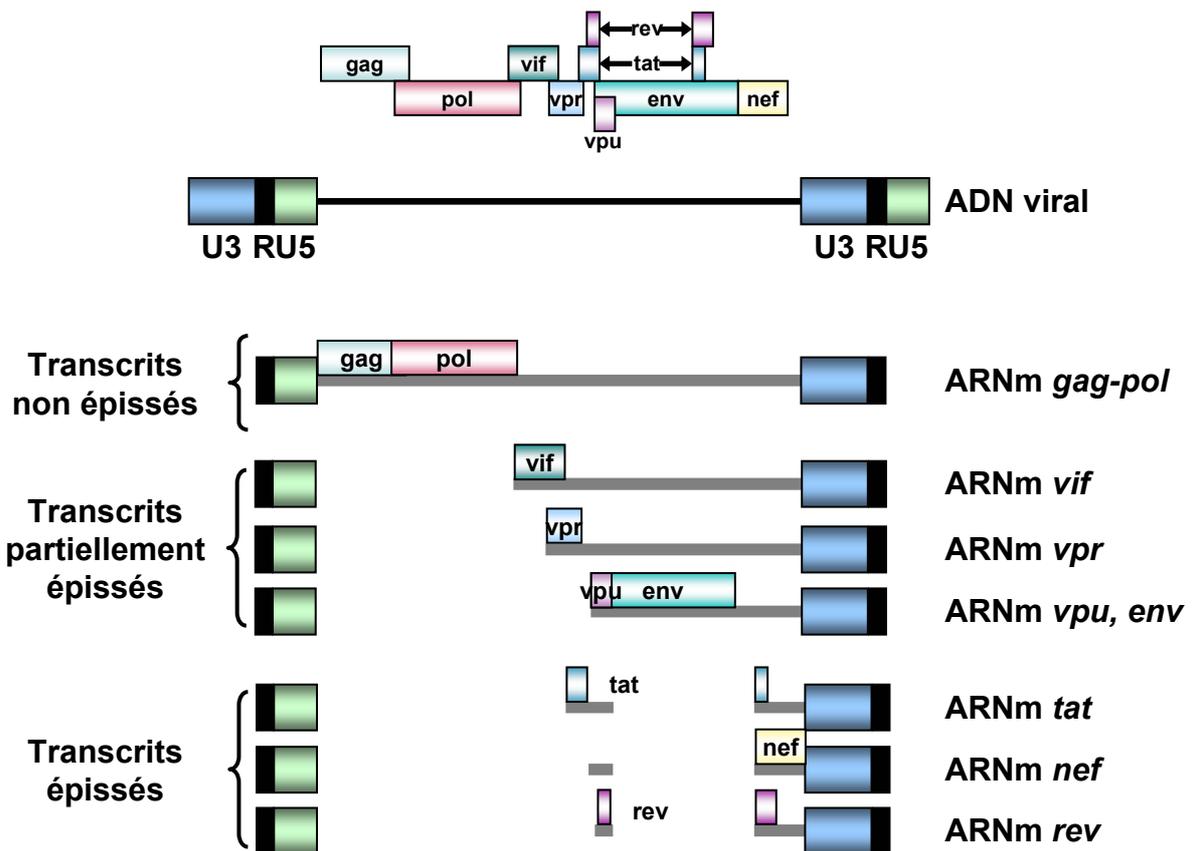
complémenter *in vitro* l'activité d'intégration de PIC non fonctionnels (Lee and Craigie, 1998) et ce à de faibles concentrations, suggérant ainsi que BAF pourrait être un cofacteur naturel de l'intégration *in vivo* (Chen and Engelman, 1998). De plus, il a été montré que BAF était associé au complexe de pré-intégration (Lin and Engelman, 2003) et incorporé dans les particules virales (Mansharamani et al., 2003).

Enfin, une protéine identifiée récemment semble être nécessaire à l'attachement des PIC à la chromatine (Maertens et al., 2003). Il s'agit de la protéine LEDGF/p75 (« Lens Epithelium Growth Factor »), qui est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes et dans la réponse cellulaire au stress. La protéine LEDGF/p75 interagit avec l'intégrase et est nécessaire à une réaction d'intégration concertée *in vitro* (Cherepanov et al., 2003) et à l'attachement à la chromatine de l'IN (Maertens et al., 2003). La protéine LEDGF/p75 possède un NLS qui permet l'import nucléaire de l'IN (Maertens et al., 2004) mais l'attachement à la chromatine de l'IN est médiée par un autre domaine de LEDGF/p75 (Vanegas et al., 2005). La protéine LEDGF/p75 est également un composant du PIC (Llano et al., 2004b) et empêche la dégradation par le protéasome de l'intégrase (Llano et al., 2004a).

L'ensemble de ces facteurs cellulaires permet donc de favoriser l'efficacité de la réaction d'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire mais les mécanismes impliqués ne sont pas totalement élucidés.

### **3.5. Transcription du génome viral**

La transcription de l'ADN viral est réalisée par la machinerie cellulaire à partir du promoteur viral contenu dans le LTR 5'. La transcription du provirus est régulée notamment par la fixation des facteurs cellulaires sur le promoteur viral. La protéine virale Tat augmente la transcription du VIH-1 en se fixant sur l'ARN viral TAR et en recrutant le complexe P-



**Figure 15. Différentes classes de transcrits viraux.**

La transcription du génome du VIH-1 conduit à la formation de transcrits qui peuvent être divisés en trois classes : les ARN viraux non épissés qui codent les polyprotéines Gag et Gag-Pol, les ARN viraux partiellement épissés qui codent les protéines Vif, Vpr, Vpu et Env, et les transcrits complètement épissés qui codent les protéines Tat, Rev et Nef.

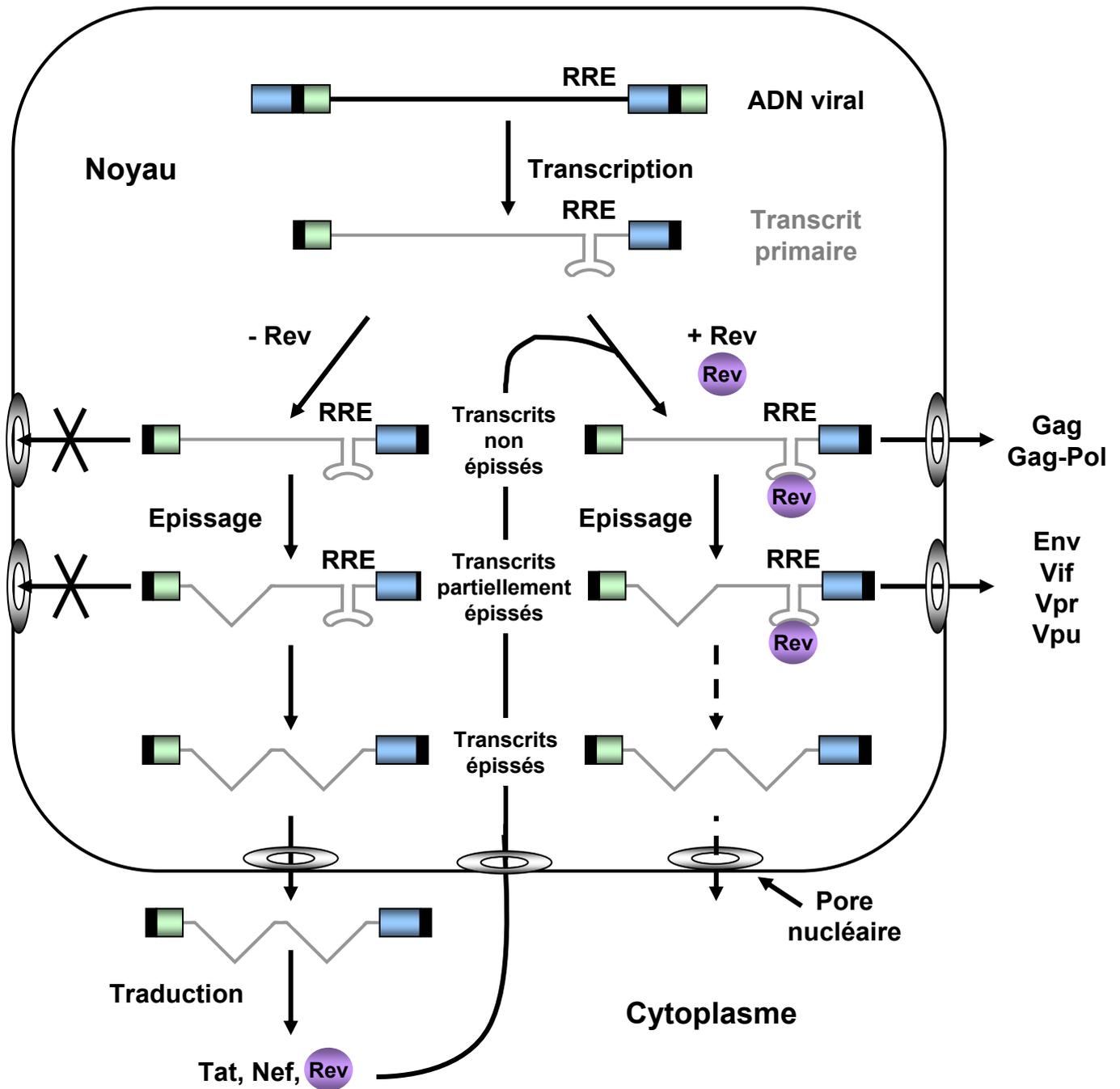
TEFb qui favorise l'élongation de la transcription. Une présentation détaillée de la régulation de la transcription du génome viral sera donnée dans le chapitre suivant.

### **3.6. Export des ARNm viraux vers le cytoplasme et synthèse des protéines virales**

La transcription du génome du VIH-1 conduit à la formation d'une trentaine de transcrits. Ces transcrits peuvent être divisés en trois classes (**Figure 15**) : 1) les ARN viraux non épissés (c'est à dire de taille génomique) qui sont soit traduits en précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol, soit dirigés vers la membrane plasmique pour être encapsidés dans les futurs virions ; 2) les ARN viraux partiellement épissés dont la taille est d'environ 5 kb et qui codent les protéines Env, Vif, Vpu et Vpr ; 3) et enfin les transcrits de petite taille (environ 2 kb), complètement épissés, qui codent les protéines Rev, Tat et Nef.

Afin d'éviter la traduction de séquences introniques, seuls les ARNm cellulaires complètement épissés sont exportés vers le cytoplasme. La nécessité pour le VIH-1 d'avoir des transcrits partiellement ou non épissés dans le cytoplasme pour produire une partie de ses protéines pose donc un problème qui est contourné par la protéine virale auxiliaire Rev. L'export des ARN viraux de taille génomique ou partiellement épissés est favorisé grâce à l'interaction de Rev avec la séquence RRE localisée au niveau du gène *env*. La fixation de Rev sur la séquence RRE conduit à la formation d'un complexe capable d'interagir avec la machinerie d'export nucléaire. En recrutant le facteur cellulaire d'export nucléaire Crm1 (« Chromosome region maintenance 1 ») de la famille des importines  $\beta$ , la protéine Rev permet le transit des transcrits viraux partiellement ou non épissés par les pores nucléaires pour qu'ils atteignent le cytoplasme (pour revue (Cullen, 2003) (**Figure 16**).

Puisque les transcrits codant les protéines Tat, Rev et Nef sont complètement épissés, ils sont rapidement exportés vers le cytoplasme comme les ARNm cellulaires et traduits. La



**Figure 16. Régulation de l'export des transcrits viraux vers le cytoplasme par Rev.**

La protéine Rev permet le transit des transcrits viraux partiellement ou non épissés par les pores nucléaires *via* son interaction avec la séquence RRE. Les ARNm codant les protéines Tat, Rev et Nef sont des transcrits totalement épissés, ils ne requièrent donc pas la présence Rev pour être exportés vers le cytoplasme. En conséquence, Tat, Rev et Nef sont les premières protéines virales à être synthétisées. Lorsque la quantité de protéine Rev atteint un seuil critique, Rev favorise l'export des ARNm viraux partiellement ou non épissés. Les précurseurs protéiques Gag et Gag-pol et les protéines Env, Vif, Vpu et Vpr sont alors synthétisés. D'après Cullen, 2003.

présence de Tat augmente alors la transcription du génome viral ce qui conduit à l'accumulation de plus en plus de protéines précoces. Lorsque la quantité de protéine Rev atteint un seuil critique, elle est importée dans le noyau grâce à son NLS et elle se fixe sur les ARN contenant la séquence RRE. L'export nucléaire des complexes ARN-Rev implique l'interaction du signal d'export nucléaire (NES, « Nuclear Export Signal ») de Rev avec Crm1 en présence de l'enzyme Ran-GTPase liée au GTP. L'hydrolyse du GTP en GDP dans le cytoplasme permet la libération des complexes ARN-Rev. Les précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol et les protéines Env, Vif, Vpu et Vpr sont alors synthétisées (**Figure 16**).

### **3.7.Modifications de l'environnement de la cellule infectée**

L'expression des protéines virales va induire des modifications de l'environnement de la cellule infectée. Ces modifications ont notamment pour effet de protéger la cellule infectée du système immunitaire et de la mort par apoptose (pour revue (Peterlin and Trono, 2003)). La protéine auxiliaire Nef est majoritairement impliquée dans ces modifications. Notamment, la protéine Nef, ainsi que les protéines Env et Vpu, induisent la sous-expression du récepteur CD4 à la surface des cellules. La sous-expression de CD4 permet d'empêcher la surinfection de la cellule et de diminuer la formation des complexes CD4-Env à la surface de la cellule. Ceci a pour effet une meilleure incorporation des glycoprotéines Env lors de l'assemblage et donc favorise la production des particules virales infectieuses. Nef diminue également l'expression des molécules du CMH-I à la surface des cellules. Cette activité protège les cellules infectées de la lyse par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Enfin, la protéine Nef bloque l'apoptose des cellules infectées par différents mécanismes. Ainsi, Nef prolonge la vie de la cellule infectée et optimise la réplication virale.

## **3.8. Assemblage des particules virales**

### **3.8.1. Rôles du précurseur Gag pr55 dans l'assemblage**

Le précurseur Gag pr55 joue un rôle majeur dans l'assemblage des particules virales (pour revue (Bukrinskaya, 2004)). Gag pr55 est composé des protéines de matrice (MA, p17), de capsid (CA, p24), d'un polypeptide p2, de la nucléocapsid (NC, p7), et des polypeptides p1 et p6. Il permet le recrutement de l'ARN viral génomique, des protéines virales Gag, Pol et Env et des protéines cellulaires impliquées dans les processus d'assemblage et de bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique.

La protéine MA est responsable du ciblage et de l'attachement de Gag à la membrane plasmique de la cellule hôte. L'interaction de la protéine NC avec l'ARN viral simple brin de taille génomique permet l'encapsulation. Enfin, la multimérisation des précurseurs Gag et Gag-Pol est permise par un domaine localisé à l'extrémité C-terminale de CA.

### **3.8.2. Biosynthèse, maturation, transport et incorporation des glycoprotéines d'enveloppe gp160**

Le précurseur Env gp160 des glycoprotéines d'enveloppe est synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique granuleux puis transporté dans le réticulum endoplasmique lisse grâce à son peptide signal. Le précurseur gp160 subit ensuite plusieurs modifications : N-glycosylations, formation de ponts disulfures, repliement et oligomérisation. Le précurseur gp160 est transporté à la surface cellulaire par la machinerie de sécrétion. Le clivage du précurseur gp160 en gp120-gp41 s'effectue dans l'appareil de Golgi par des endoprotéases cellulaires de type furine. Les glycoprotéines d'enveloppe sont incorporées dans la particule virale *via* des interactions entre le domaine intracytoplasmique de la gp41 et la partie N-terminale de la protéine MA.

### 3.8.3. Incorporation des protéines virales et cellulaires

Les protéine auxiliaires Vpr et Vif sont incorporées dans les virions : Vpr *via* une interaction avec p6 (Muller et al., 2000) et Vif *via* des interactions avec Gag pr55 et l'ARN viral (Liu et al., 1995). La CypA est incorporée dans les virions par une interaction avec la protéine CA (Franke et al., 1994) et augmente l'infectivité du virus à une étape post-entrée (cf. § 3.1.3).

Plusieurs protéines cellulaires sont impliquées dans les étapes tardives du cycle viral. Notamment, la protéine HP68, une protéine fixant l'ATP identifiée précédemment comme un inhibiteur de la RNase L, est associée aux protéines Gag et Vif et favorise l'assemblage des particules virales immatures (Zimmerman et al., 2002).

## 3.9. Bourgeoisement et maturation des particules virales

Le processus de bourgeoisement représente le second évènement de fusion membranaire permettant au virus de compléter son cycle viral (pour revue (Demirov and Freed, 2004)).

### 3.9.1. Bourgeoisement des particules virales

Le motif PTAP (Pro-Thr-Ala-Pro) dans le domaine p6 du précurseur Gag joue un rôle crucial dans le bourgeoisement des particules virales (Demirov et al., 2002). La voie des endosomes est impliquée dans le bourgeoisement. Les complexes ESCRT (« Endosomal Sorting Complex Required for Transport ») acheminent les protéines des compartiments de biosynthèse ou d'endocytose vers les corps multivésiculaires (MVB, « Multivesicular Body ») puis vers les lysosomes. L'interaction de la protéine p6 avec un des composants du complexe ESCRT-1, la protéine Tsg101 (« Tumor susceptibility gene 101 »), est nécessaire à un bourgeoisement efficace (Garrus et al., 2001). De même, l'ATPase AAA Vps4 (« ATPase-Associated with cellular Activities Vacuolar Protein Sorting protein 4 ») est impliquée dans le bourgeoisement (Garrus et al., 2001). Enfin, la protéine p6 interagit également avec AIP-1

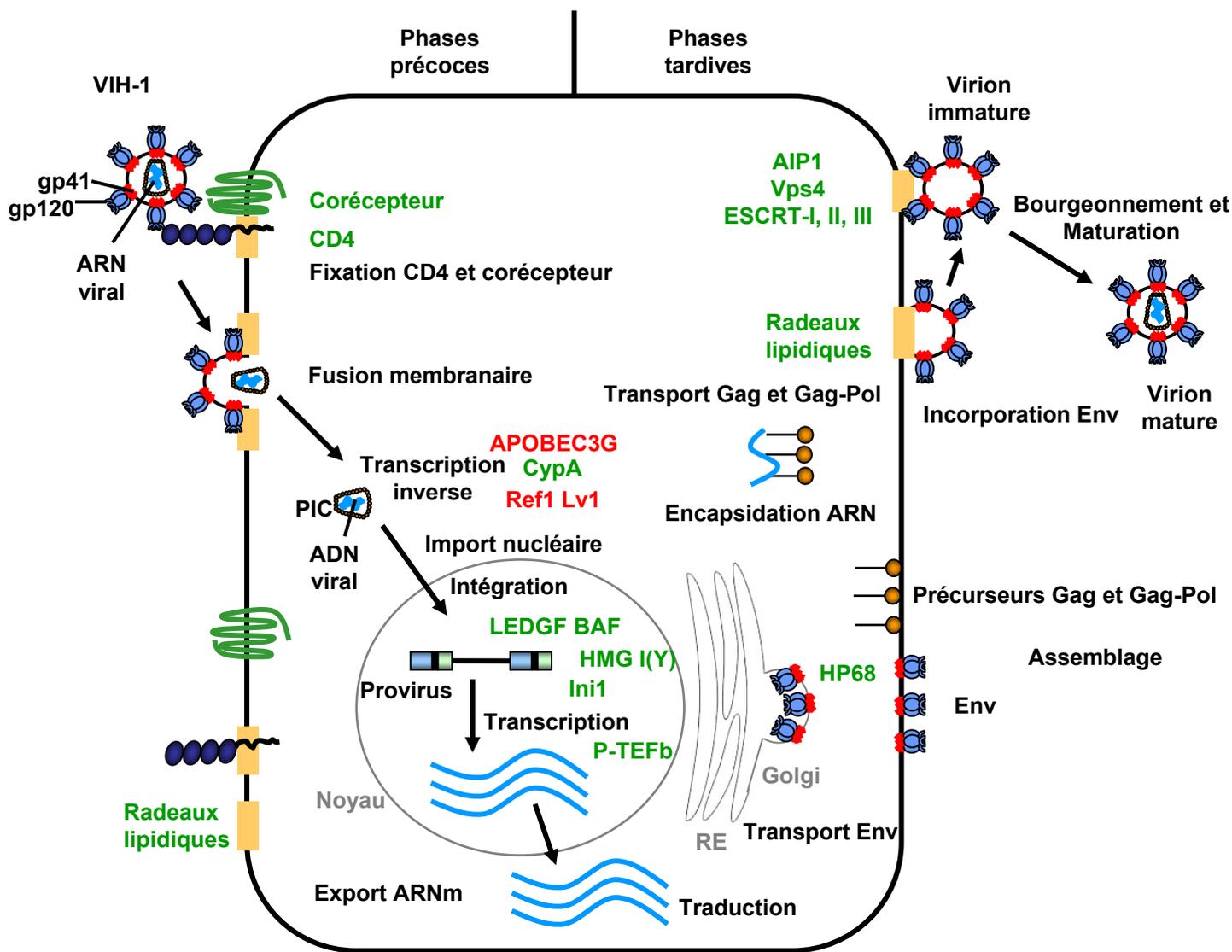


Figure 17. Facteurs cellulaires impliqués dans le cycle de réplication du VIH-1.

Les différentes étapes du cycle viral sont représentées. Les facteurs cellulaires favorisant la réplication virale sont indiqués en vert et ceux l'inhibant sont indiqués en rouge. D'après Freed, 2004.

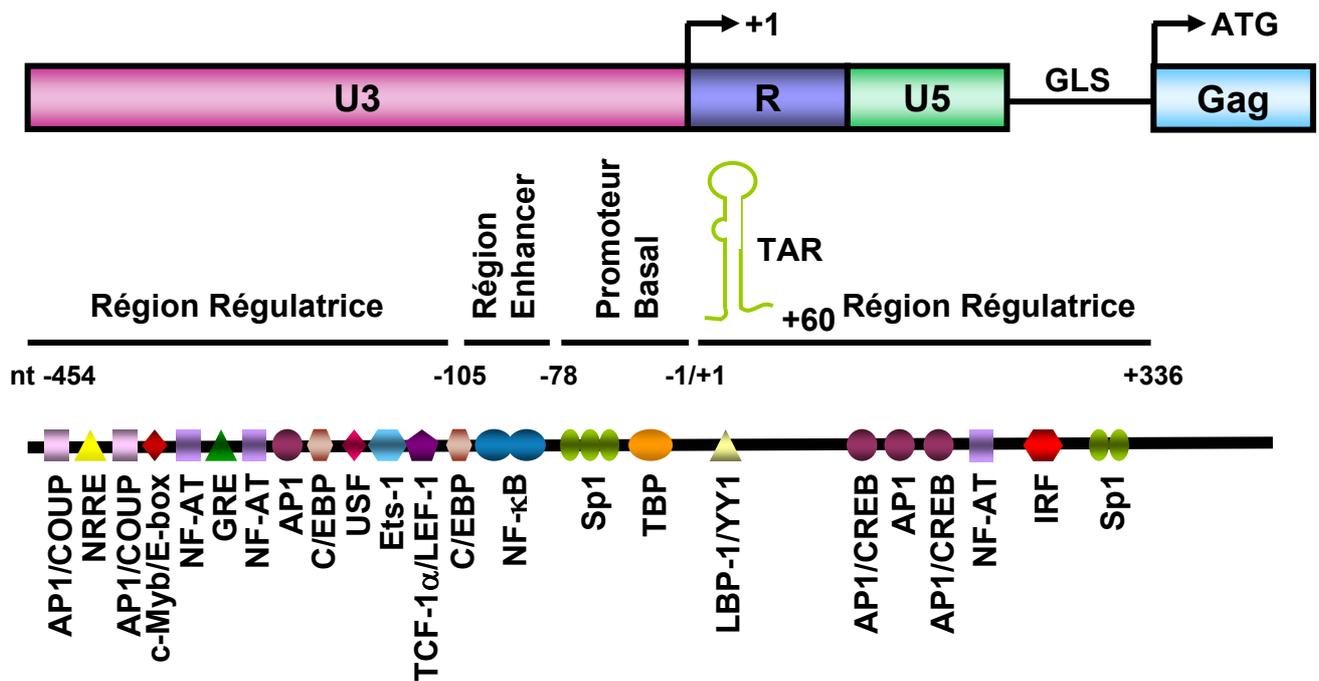
(« Apoptosis-Linked Gene 2 Interacting Protein 1 ») (Strack et al., 2003) qui agit comme un connecteur entre ESCRT-I et ESCRT-III dans les cellules en s'associant avec Tsg101. La fixation directe de p6 à AIP-1 ou à des complexes AIP-1/Tsg101 conduit au recrutement de ESCRT-III au niveau du site de bourgeonnement. Ainsi, le recrutement des complexes ESCRT par le précurseur Gag au niveau de la membrane plasmique favorise le bourgeonnement du virus.

Les précurseurs Gag sont associés avec les radeaux lipidiques (Lindwasser and Resh, 2001; Ono and Freed, 2001) qui ont été décrits comme des plateformes d'assemblage et de bourgeonnement de plusieurs virus enveloppés, dont le VIH-1.

### **3.9.2. Maturation des particules virales**

Les virions ayant bourgeonnés de la membrane plasmique de la cellule hôte ne sont pas infectieux et doivent subir une étape de maturation (pour revue (Bukrinskaya, 2004)). La maturation est réalisée par la protéase virale qui va cliver les précurseurs Gag et Gag-Pol de façon séquentielle en protéines matures Gag (MA, CA, NC, p6) et Pol (PR, IN, RT). Le clivage protéolytique est une étape critique dans la morphogénèse du VIH-1 qui permet le changement en forme conique du « core » viral. La maturation est la dernière étape du cycle de réplication du VIH-1 et est indispensable à la production de virus infectieux.

En conclusion, le cycle de réplication du VIH-1 fait intervenir de nombreuses interactions entre le virus et sa cellule hôte. La **Figure 17** représente les différentes étapes du cycle viral dans lesquelles interviennent des protéines cellulaires.



**Figure 18. Organisation du LTR 5' du VIH-1.**

Le LTR 5' est composé des régions U3, R et U5. Le site d'initiation de la transcription (+1) à la jonction U3-R est indiqué par une flèche. La séquence leader GLS ainsi que le début de la séquence codante pour Gag (ATG) sont représentés. La région U3 contient une région régulatrice (nt -454 à -104) comportant de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription cellulaires. La région « enhancer » (nt -105 à -79) contient deux sites de fixation pour NF- $\kappa$ B. Le promoteur basal (nt -78 à +1) contient une boîte TATA fixant la protéine TBP et trois sites de fixation pour le facteur Sp1. L'élément de réponse à la transactivation TAR (nt +1 à +60) est localisé dans la région R. En aval du site d'initiation se trouve une région régulatrice comportant trois sites de fixation pour AP1, un site pour NF-AT, un site pour IRF et deux sites pour Sp1.

## 4. REGULATION DE LA TRANSCRIPTION DU VIH-1

La régulation de l'expression du VIH-1 dans ses réservoirs cellulaires a lieu principalement au niveau transcriptionnel. La régulation de la transcription du VIH-1 résulte d'une relation complexe entre les éléments de régulation présents en *cis* sur le promoteur viral (LTR), la structure chromatinienne, les facteurs de transcription cellulaires et la protéine virale transactivatrice Tat.

### 4.1.Éléments de régulation de la transcription présents en *cis* sur le promoteur viral

Le LTR 5', défini par les régions U3, R et U5, contient les éléments responsables de la régulation transcriptionnelle du VIH-1 (**Figure 18**). Le LTR peut être divisé en différents domaines fonctionnels : une région régulatrice, un élément « enhancer » et le promoteur basal, situés dans la région U3, un élément de réponse à la transactivation situé dans la région R ainsi qu'une région régulatrice située en aval du site d'initiation de la transcription (pour revue (Roebuck and Saifuddin, 1999)).

#### 4.1.1. Promoteur basal

Le promoteur basal (nt -78 à +1) contient trois sites de liaison pour le facteur de transcription Sp1 (« Stimulatory Protein 1 ») ainsi qu'une boîte TATA située en amont du site d'initiation de la transcription localisé à la jonction U3-R (**Figure 18**).

La boîte TATA (nt -27 à -23) fixe le facteur général de transcription TFIID, composé de la protéine TBP (« TATA Binding Protein ») et des facteurs TAFII (« TBP-Associated Factors »). L'interaction de la protéine TBP avec Tat est nécessaire à la transactivation du LTR par Tat (Majello et al., 1998). La protéine Tat interagit également avec l'ARN

polymérase II (Cujec et al., 1997) et le facteur TAFII250 (Weissman et al., 1998), suggérant un rôle de Tat dans le recrutement du complexe de pré-initiation de la transcription.

La région riche en GC située juste en amont de la boîte TATA contient trois sites de fixation pour le facteur ubiquitaire Sp1 (nt -78 à -46) (Jones et al., 1986). La fixation du facteur Sp1 contribue au niveau de transcription basal et à la transactivation du LTR (Sune and Garcia-Blanco, 1995) *via* une interaction avec la protéine Tat (Jeang et al., 1993). Le facteur Sp1 est également capable de recruter le complexe P-TEFb et donc d'augmenter la processivité de la transcription en absence de Tat (Yedavalli et al., 2003).

L'élément initiateur bipartite définit le site d'initiation de la transcription localisé à la jonction U3-R. La fixation des protéines LBP-1 (« Leader Binding Protein-1 ») (nt -16 à +27) et YY1 (« Yin Yang 1 ») (nt -17 à +25) (Margolis et al., 1994) au niveau du site d'initiation exerce un effet inhibiteur sur la transcription du promoteur viral.

#### 4.1.2. Région « enhancer »

La région « enhancer » (nt -105 à -79) contient deux sites de liaison pour le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (« Nuclear Factor- $\kappa$ B ») (nt -104 à -95 et -91 à -81) (Nabel and Baltimore, 1987) (**Figure 18**).

Le facteur NF- $\kappa$ B est induit en réponse à divers signaux d'activation cellulaire comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , « Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  ») et les esters de phorbols (PMA, « Phorbol Myristyl Acetate ») (pour revue (Hayden and Ghosh, 2004)). Dans les cellules non stimulées, le facteur NF- $\kappa$ B (p50/p65) est séquestré dans le cytoplasme par la protéine inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$ . En réponse à une stimulation cellulaire, la protéine inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$  est phosphorylée par le complexe IKK (« I $\kappa$ B Kinase »), ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. La dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  libère le facteur NF- $\kappa$ B et entraîne sa translocation dans le noyau où il active la transcription des gènes cibles (pour revue (Hayden and Ghosh, 2004)).

La fixation du facteur NF- $\kappa$ B sur la région « enhancer » augmente l'activité transcriptionnelle du promoteur viral dans les cellules T et les macrophages (Israel et al., 1989; Mellors et al., 1991). Le facteur NF- $\kappa$ B coopère avec les facteurs Sp1 et TFIID pour augmenter l'activité transcriptionnelle du promoteur (Guermah et al., 1998). De plus, la protéine Tat active le facteur NF- $\kappa$ B (Demarchi et al., 1996). Comme Sp1, NF- $\kappa$ B recrute le complexe P-TEFb en absence de Tat et stimule l'élongation de la transcription (Barboric et al., 2001). Le facteur NF- $\kappa$ B et la région « enhancer » jouent donc un rôle fondamental dans l'activation de la transcription du LTR.

#### 4.1.3. Région régulatrice en amont du site d'initiation de la transcription

La région régulatrice localisée dans la région U3 (nt -454 à -104) contient de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription cellulaires modulant la transcription virale (pour revue (Pereira et al., 2000)) (**Figure 18**). Cette région contient des sites de fixation pour les facteurs TCF-1 $\alpha$  (« T Cell-specific Factor-1 $\alpha$  ») / LEF-1 (« Lymphoid Enhancer-binding Factor-1 ») (nt -142 à -122), Ets-1 (nt -149 à -141), USF (« Upstream Stimulatory Factor ») (-166 à -161), C/EBP (« CCAAT / Enhancer Binding Protein ») (nt -132 à -97 et -170 à -157), NF-AT (« Nuclear Factor of Activated T cells ») (nt -303 à -288 et nt -254 à -216), c-Myb (nt -304 à -299), AP1 (« Activated Protein 1 ») (nt -357 à -324 et -306 à -285) et les récepteurs nucléaires *via* un élément de réponse aux récepteurs nucléaires ou NRRE (« Nuclear Receptor Responsive Element ») (nt -356 à -320) et un élément GRE (« Glucocorticoid Receptor Element ») (nt -264 à -259).

La fixation des différents facteurs de transcription cellulaires sur la région régulatrice du promoteur peut exercer des effets positifs ou négatifs sur la transcription du génome viral selon le type cellulaire (pour revue (Rohr et al., 2003)). Par exemple, les facteurs C/EBP sont nécessaires à la réplication virale dans les macrophages primaires mais pas dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Henderson and Calame, 1997). En revanche, les protéines NF-AT

activent la transcription dans les lymphocytes primaires T CD4<sup>+</sup> en synergie avec NF-κB et Tat (Kinoshita et al., 1997).

#### 4.1.4. Région régulatrice en aval du site d'initiation de la transcription

Une des caractéristiques du promoteur du VIH-1 est la présence d'éléments de régulation de la transcription en aval du site d'initiation de la transcription, localisés dans les régions R, U5 et GLS (« Gag Leader Sequence ») (**Figure 18**). Ces éléments de régulation ont été identifiés par des expériences d'empreinte à la DNase I (Verdin, 1991). Verdin et collaborateurs ont identifié des sites hypersensibles à la DNase I (DHS, « DNase I Hypersensitive Site ») dans le génome du VIH-1 : deux sites DHS (DHS2 et DHS3) localisés dans la région U3 du LTR 5', un site DHS4 localisé en aval du site d'initiation de la transcription, un site DHS7 localisé dans le gène *pol* (Van Lint et al., 1994) et un site DHS8 au niveau du site de polyadénylation du LTR 3' (Verdin, 1991). Par la suite, des expériences d'empreinte à la DNase I et de retard sur gel réalisées dans la région située en aval du site d'initiation de la transcription ont permis d'identifier des sites de fixation pour des facteurs de transcription cellulaires : trois sites de fixation en tandem pour AP1 ((I) nt +87 à +94, (II) nt +118 à +125 et (III) nt +155 à +163), un site contenant un motif AP3-like (nt +162 à +177), un site fixant un facteur DBF1 (« Downstream Binding Factor 1 ») (nt +200 à +219) et deux sites adjacents pour le facteur Sp1 (nt +270 à +291) (El Kharroubi and Verdin, 1994).

La fixation des protéines AP1 et CREB/ATF (« cAMP Responsive Element Binding protein / Activating Transcription Factor ») (Rabbi et al., 1997b) sur les sites AP1 permet l'activation transcriptionnelle du LTR (Rabbi et al., 1997a; Roebuck et al., 1996).

Les travaux de Van Lint et collaborateurs (Van Lint et al., 1997) ont permis d'identifier le site AP3-like comme un site de fixation pour le facteur NF-AT et le site DBF1 comme un site de fixation pour les facteurs de régulation de l'interféron ou IRF (« Interferon Regulatory Factor »). Les sites IRF et Sp1 sont occupés *in vivo* et la mutation ou la délétion du site IRF

entraîne une diminution de la transcription basale du promoteur viral et de la réplication (El Kharroubi and Verdin, 1994; Li et al., 1997; Liang et al., 1997). La mutation des sites AP1 (III) et NF-AT inhibe la transcription du promoteur mais n'a pas d'effet sur la réplication du VIH-1. En revanche, les provirus mutés dans les sites Sp1 sont complètement défectifs pour la transcription et la réplication. Les défauts de réplication observés par les mutations de ces sites corrélerent avec une inhibition de la transcription des promoteurs mutés (Van Lint et al., 1997). En accord avec ces résultats, un provirus intégré et muté dans les sites AP1 (III), NF-AT, IRF et Sp1 n'a aucune activité transcriptionnelle (El Kharroubi and Martin, 1996).

Ces expériences montrent que les sites localisés en aval du site d'initiation de la transcription sont nécessaires à l'activation transcriptionnelle du LTR et importants pour l'infectivité du virus.

#### **4.1.5. Élément de réponse à la transactivation TAR**

La région R permet la synthèse de l'élément de réponse à la transactivation TAR (nt +1 à +60) (**Figure 18**). Il s'agit d'une structure ARN avec laquelle interagit la protéine transactivatrice Tat pour favoriser l'élongation de la transcription (cf. § 4.3.2).

La présence de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription cellulaires au niveau du promoteur viral rend la régulation de la transcription du VIH-1 complexe. Ces facteurs peuvent exercer divers effets sur la transcription en fonction du type cellulaire et des interactions entre les différents facteurs. Cependant, les sites essentiels et les facteurs associés impliqués dans la régulation de la transcription du VIH-1 sont Sp1, NF- $\kappa$ B et la protéine virale Tat.

## **4.2. Rôle de la chromatine dans la régulation transcriptionnelle du VIH-1**

Depuis quelques années, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle de la chromatine dans la régulation de l'expression des gènes. Au niveau du LTR, l'organisation de la chromatine joue également un rôle dans la transcription du VIH-1 et ajoute un niveau de complexité dans la régulation de l'expression du VIH-1 (pour revues (He et al., 2002; Pumfery et al., 2003; Van Lint, 2000)).

### **4.2.1. Rôle de la chromatine dans la régulation transcriptionnelle**

#### **4.2.1.1. Remodelage de la chromatine et régulation de la transcription**

Dans le noyau de la cellule, la chromatine est hétérogène : les gènes transcriptionnellement actifs sont caractérisés par une structure chromatinienne relâchée (euchromatine) alors que les gènes transcriptionnellement inactifs sont retrouvés au sein d'une structure chromatinienne très condensée (hétérochromatine) (Paranjape et al., 1994). La régulation de l'expression des gènes fait intervenir des complexes qui modifient la structure de la chromatine et facilitent ainsi l'accessibilité des gènes aux facteurs de transcription spécifiques et à la machinerie de transcription basale.

Le remodelage de la chromatine est donc un processus dynamique de régulation transcriptionnelle dans lequel intervient un changement de structure des nucléosomes. L'action de complexes ATP-dépendants et l'altération de la conformation histone-ADN par modifications post-traductionnelles des histones sont impliqués dans le remodelage de la chromatine (pour revue (Narlikar et al., 2002)).

#### **4.2.1.2. Complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants**

Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants sont des complexes multi-protéiques divisés en trois grandes classes selon la nature de leur sous-unité ATPase : SWI/SNF (« Switch/Sucrose Non Fermenting »), ISWI (« Imitation Switch ») et Mi-2/CHD (pour revue (Vignali et al., 2000)). Les sous-unités des complexes SWI/SNF requises pour le

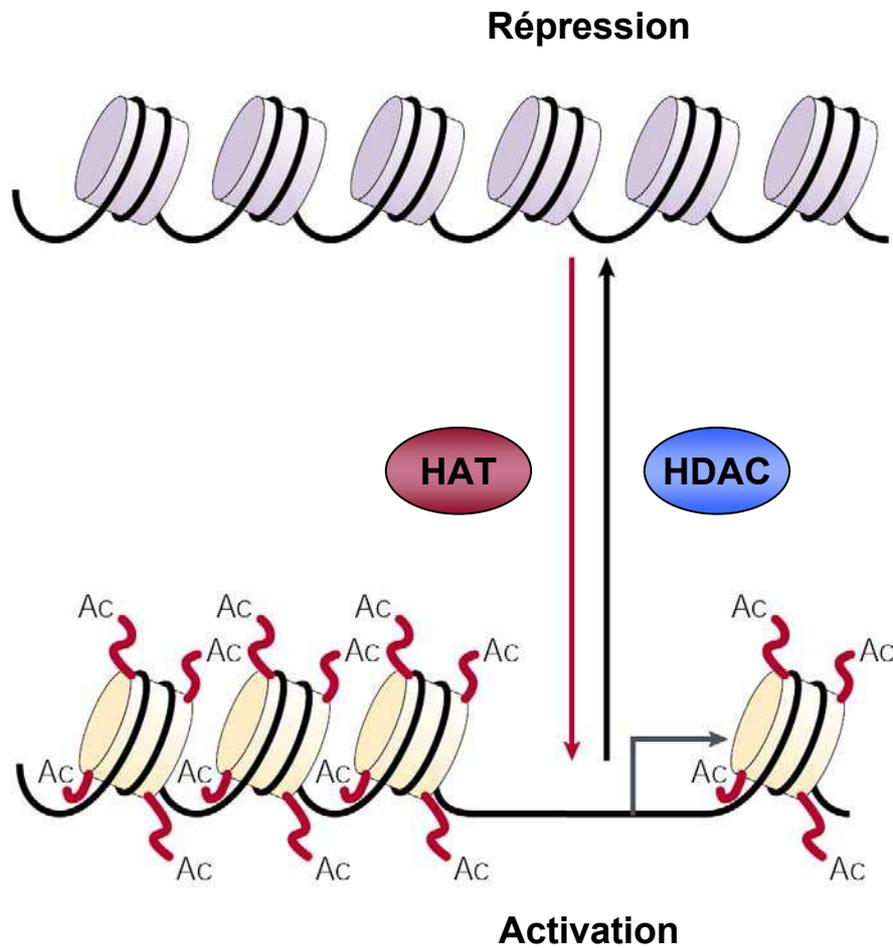
remodelage de la chromatine *in vitro* sont les sous-unités ATPases hBrm (« human Brahma ») ou BRG1 (« Brahma Related Gene 1 »), SNF5/Ini1, et les facteurs associés BAF155 (« BRG1/hBrm-Associated Factors ») et BAF170 (pour revue (Roberts and Orkin, 2004)).

La première étape du mécanisme de remodelage de la chromatine par les complexes SWI/SNF est la fixation du complexe de remodelage à la chromatine de façon ATP-indépendante. L'altération des interactions histone-ADN modifie la conformation du nucléosome en perturbant l'enroulement de l'ADN autour de l'octamère d'histone. Ce remodelage de la chromatine est dépendant de l'ATP. Le remodelage permet le glissement d'un octamère d'histone en *cis* à une position différente sur la même molécule d'ADN ou le transfert d'un octamère d'histone en *trans* sur une molécule d'ADN différente (pour revue (Roberts and Orkin, 2004)).

#### **4.2.1.3. Modifications post-traductionnelles des histones**

Les histones sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles qui sont impliquées dans la régulation de la transcription des gènes. Certains résidus de l'extrémité N-terminale des histones peuvent être acétylés, méthylés, phosphorylés ou ubiquitinylés (pour revue (Berger, 2002)). Ces modifications peuvent affecter directement la structure de la chromatine en modifiant la charge des histones ou permettre le recrutement de facteurs de remodelage ou de transcription qui vont réguler l'expression des gènes.

L'acétylation des histones a été la modification post-traductionnelle la plus étudiée. L'acétylation des histones corrèle avec une activation transcriptionnelle, alors qu'une déacétylation des histones conduit à une répression transcriptionnelle (pour revue (Eberharter and Becker, 2002)). L'acétylation de résidus lysine situés à l'extrémité N-terminale des histones induit la neutralisation d'une charge positive qui entraîne une répulsion électrostatique de l'ADN, une décondensation de la structure du nucléosome et facilite ainsi la fixation de facteurs de transcription.



**Figure 19. Activités histone acétyltransférases HAT et déacétylases HDAC.**

Le niveau d'acétylation des histones est régulé par un équilibre dynamique entre les activités des HAT et des HDAC. Les HAT catalysent l'acétylation de résidus lysine situés à l'extrémité N-terminale des histones. L'acétylation des histones corrèle avec une activation transcriptionnelle. Les HDAC catalysent la réaction inverse et la déacétylation des histones conduit à une répression transcriptionnelle.

Le niveau d'acétylation des histones résulte d'un équilibre dynamique entre les activités des histones acétyltransférases HAT (« Histone Acetyltransferase ») et des histones déacétylases HDAC (« Histone Deacetylase ») (pour revue (Roth et al., 2001)) (**Figure 19**). Les complexes coactivateurs possèdent une activité HAT et sont recrutés sur les promoteurs *via* une interaction avec des facteurs activateurs de la transcription. Au contraire, les complexes corépresseurs possèdent une activité HDAC et sont recrutés par des facteurs répresseurs de la transcription.

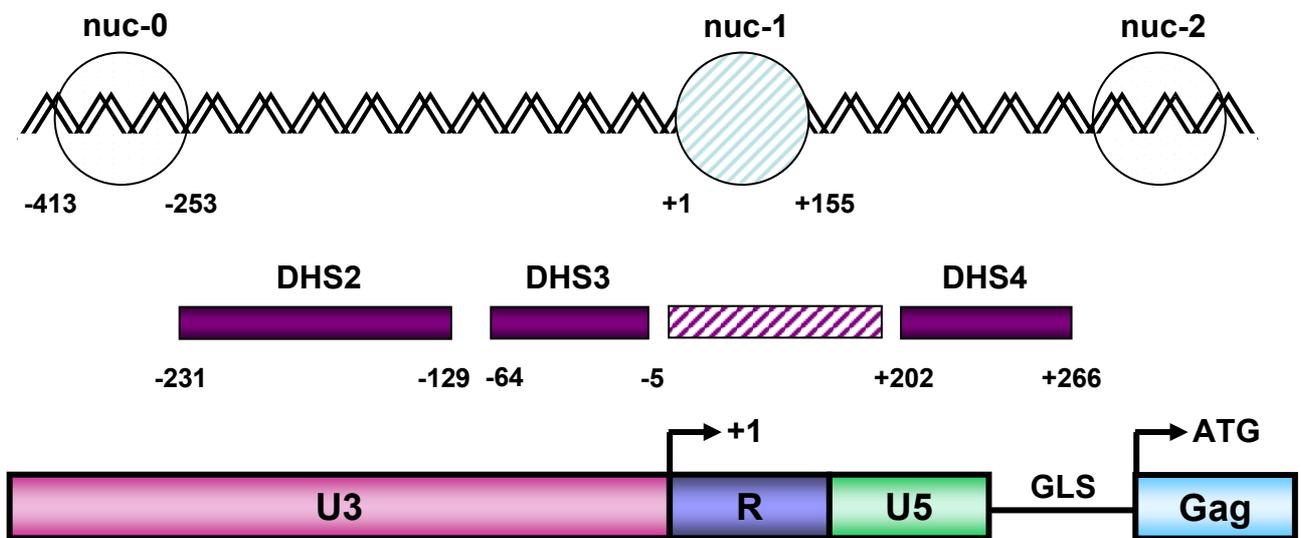
Les résidus basiques de l'extrémité N-terminale des histones peuvent subir d'autres modifications post-traductionnelles telles que la méthylation. Les histones sont méthylées sur des résidus lysine ou arginine par des histones méthyltransférases HMT (« Histone Methyltransferase ») (pour revue (Bannister et al., 2002)). Les HMT CARM1 (« Coactivator-Associated arginine Methyltransferase 1 ») et PRMT1 (« Protein arginine Methyltransferase 1 ») ciblent les résidus arginine des histones H3 et H4 respectivement.

Les différentes modifications post-traductionnelles des histones inhibent ou favorisent d'autres modifications en *cis* ou en *trans* au niveau de l'extrémité des histones (pour revue (Fischle et al., 2003)). Ainsi, la nature et le profil des nombreuses modifications post-traductionnelles des histones établissent un « code histone » et permettent une régulation complexe de la transcription des gènes en recrutant des facteurs de transcription ou des complexes de remodelage de la chromatine au niveau des promoteurs.

#### **4.2.2. Structure chromatinienne du promoteur viral**

##### **4.2.2.1. Positionnement des nucléosomes sur le LTR**

L'organisation chromatinienne du LTR 5' du VIH-1 a été étudiée par Verdin et collaborateurs (Verdin et al., 1993). Des expériences de digestion à la DNase I et à la nucléase micrococcale ont permis de positionner précisément des nucléosomes au niveau du promoteur viral (Verdin et al., 1993). Indépendamment du site d'intégration, deux nucléosomes sont



**Figure 20. Structure chromatinienne du LTR 5' du VIH-1.**

Les sites hypersensibles de digestion à la DNase I (DHS) sont indiqués et alignés avec les régions U3, R et U5 du LTR 5'. Le rectangle hachuré indique la région qui devient hypersensible à la digestion à la DNase I lors de l'activation transcriptionnelle du LTR. Les nucléosomes nuc-0, nuc-1 et nuc-2 et leurs positions sont indiqués. Le nucléosome nuc-1 est remodelé lors de l'activation de la transcription du promoteur viral.

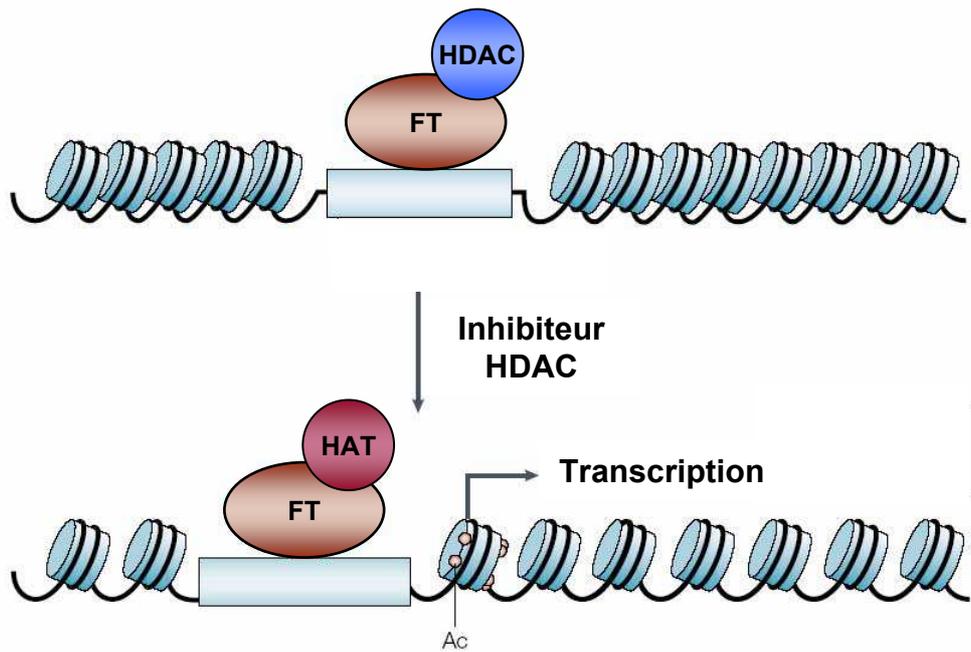
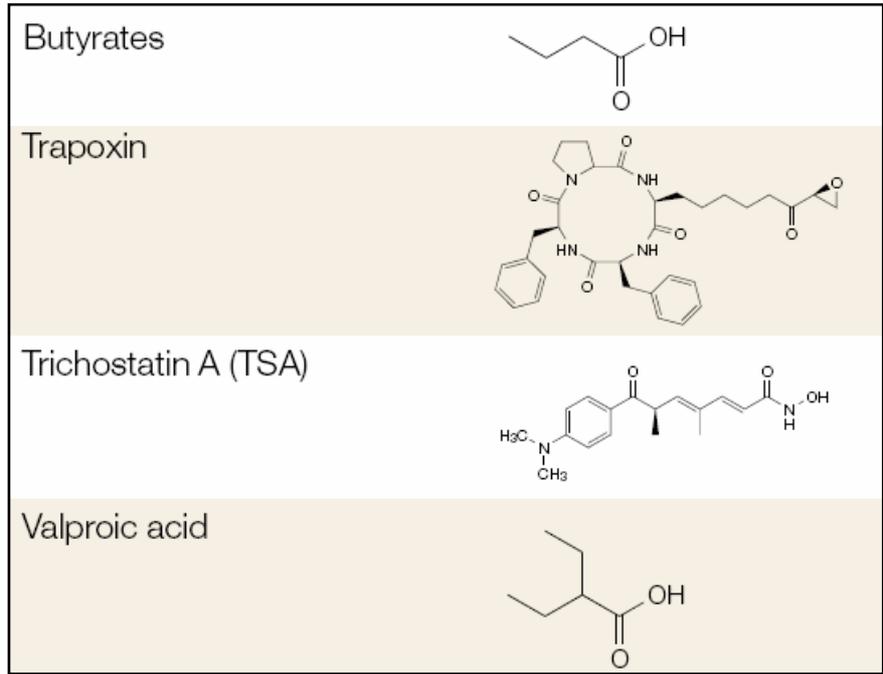
positionnés sur le LTR 5' : le nucléosome nuc-0 occupe les nucléotides -413 à -253 dans la région U3 en amont de la région régulatrice et le nucléosome nuc-1 est positionné entre les nucléotides +1 et +155 au niveau des régions R et U5 en aval du site d'initiation de la transcription (Verdin et al., 1993) (**Figure 20**). Ces deux nucléosomes définissent deux régions « libres » : la première correspond aux sites hypersensibles à la DNase I DHS2 (nt -231 à -129) et DHS3 (nt -64 à -5) localisés dans la région U3, et la seconde correspond au site DHS4 (nt +202 à +266) localisé en aval de la région U5 (Verdin et al., 1993) (**Figure 20**). Trois autres nucléosomes (nuc-2, nuc-3, et nuc-4) sont positionnés sur l'ADN proviral (Verdin et al., 1993).

#### ***4.2.2.2. Remodelage du nucléosome nuc-1 lors de l'activation transcriptionnelle***

L'activation transcriptionnelle du promoteur s'accompagne du remodelage du nucléosome nuc-1 (Verdin et al., 1993). Lors de l'activation du LTR par le PMA ou le TNF- $\alpha$ , la région entre les sites DHS3 et DHS4 (nt -5 à +202) devient hypersensible à la digestion par la DNase I (Verdin, 1991) et la nucléase micrococcale (Verdin et al., 1993) (**Figure 20**). L'analyse de la chromatine de cette région lors de l'activation transcriptionnelle a montré que le nucléosome nuc-1 était remodelé, et ce indépendamment de la réplication de l'ADN et de la transcription (Verdin et al., 1993). Le positionnement du nucléosome nuc-1, localisé immédiatement en aval du site d'initiation de la transcription, pourrait expliquer son effet inhibiteur sur la transcription du promoteur viral.

#### **4.2.3. Remodelage de la chromatine et régulation de la transcription du VIH-1**

Le remodelage du nucléosome nuc-1 étant nécessaire à l'activation transcriptionnelle du promoteur viral, les effets des modifications de la chromatine et des histones sur l'expression du VIH-1 ont donc été étudiés.



**Figure 21. Structure et fonction des inhibiteurs d'HDAC.**

La structure de quatre inhibiteurs d'HDAC (HDACi) est montrée : le butyrate et l'acide valproïque (acides gras à chaîne courte), la trichostatine A (acide hydroxamique) et la trapoxine (térapeptide cyclique). Les HDACi provoquent une hyperacétylation globale des histones en inhibant les HDAC recrutées sur les promoteurs par des interactions avec des facteurs de transcription. L'accumulation des histones acétylées par les HAT conduit à l'augmentation de la transcription des gènes. Les HDACi ont une grande variété d'effets biologiques, dont l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation et/ou l'apoptose des cellules.

#### 4.2.3.1. Effets des inhibiteurs d'HDAC

De nombreuses études ont montré une activation transcriptionnelle du promoteur viral en réponse à des inhibiteurs d'HDAC (El Kharroubi et al., 1998; Quivy et al., 2002; Sheridan et al., 1997; Van Lint et al., 1996a). Les composés inhibiteurs d'HDAC (HDACi) regroupent les acides gras à chaîne courte (butyrate et acide valproïque), les acides hydroxamiques (trichostatine A ou TSA), et les tétrapeptides cycliques (trapoxine ou TPX) (pour revue (Marks et al., 2001)) (**Figure 21**). Les HDACi inhibent les histones déacétylases recrutées sur les promoteurs cellulaires par des facteurs de transcription et provoquent une hyperacétylation globale des histones qui conduit à l'augmentation de la transcription des gènes (**Figure 21**). Les HDACi ont une grande variété d'effets biologiques, dont l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose des cellules tumorales (pour revue (Johnstone, 2002)). Ces effets pléiotropiques sont dus à l'altération de la transcription d'un petit nombre de gènes. En effet, Van Lint et collaborateurs ont montré que l'expression d'une petite fraction de gènes cellulaires (2%) était modifiée en réponse à l'hyperacétylation des histones (Van Lint et al., 1996b), suggérant que l'activation du LTR en réponse aux HDACi est spécifique et ne résulte pas d'une dérégulation globale de plusieurs gènes cellulaires.

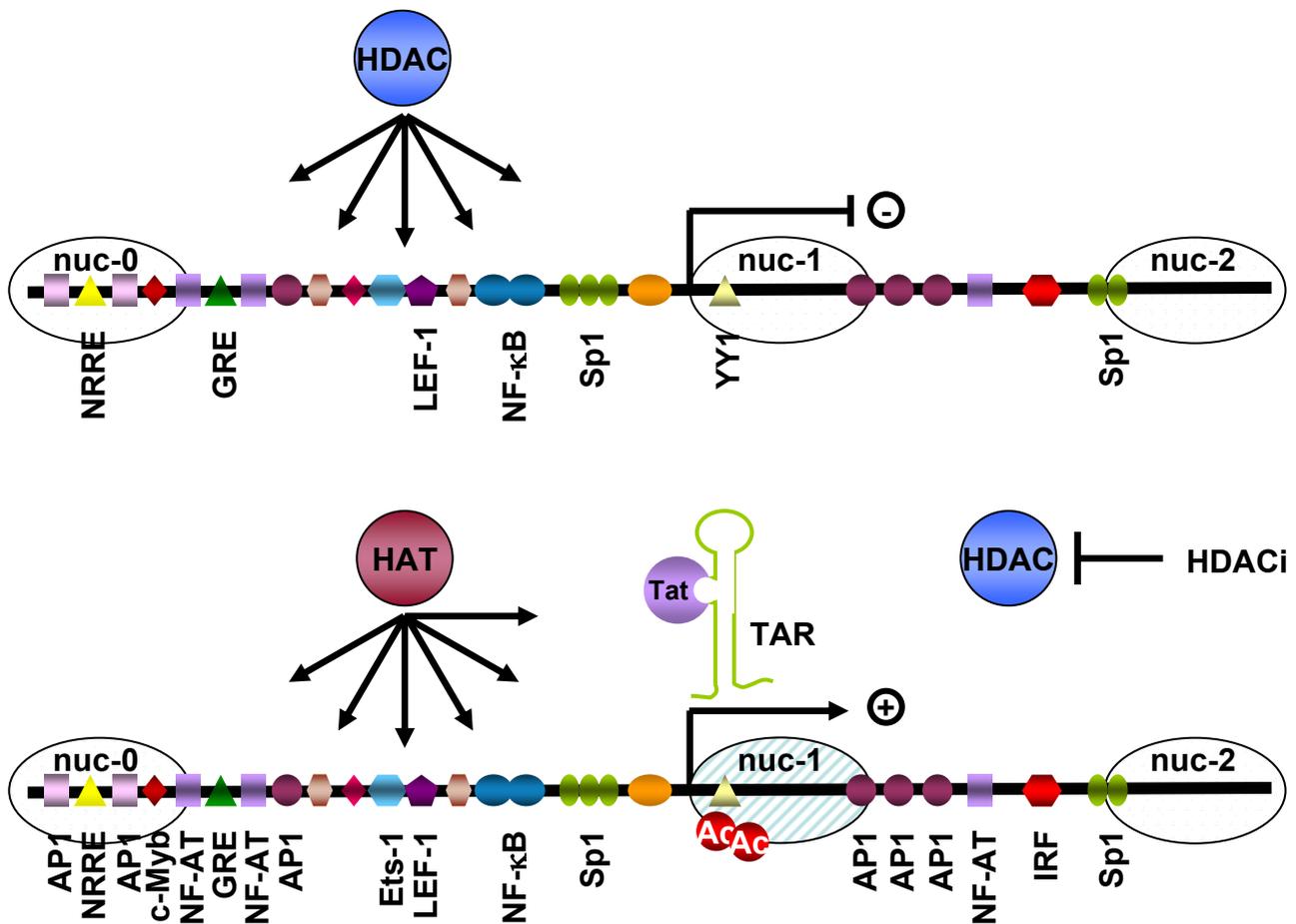
Plusieurs études ont montré que le traitement de lignées cellulaires infectées de façon chronique par le NaB induisait l'expression du VIH-1 (Bohan et al., 1987; Laughlin et al., 1993). De même, le provirus intégré peut être activé par l'acide valproïque (Moog et al., 1996). Le traitement de lignées cellulaires infectées de façon chronique par deux inhibiteurs d'HDAC, la TSA et la TPX, induit une activation transcriptionnelle du promoteur et une augmentation de la production virale (Van Lint et al., 1996a). L'activation transcriptionnelle corrèle avec le degré d'acétylation des histones et se produit en absence d'induction du facteur NF- $\kappa$ B (Van Lint et al., 1996a). La seule modification détectable au niveau de la structure chromatinienne du LTR 5' est le remodelage du nucléosome nuc-1 (Van Lint et al.,

1996a). Ces observations montrent que la modification des histones permet l'activation transcriptionnelle du promoteur viral et renforcent le rôle de nuc-1 dans la répression de la transcription du VIH-1.

#### 4.2.3.2. *Rôle des HAT*

Le rôle de l'acétylation dans la régulation de la transcription du LTR a été étudiée sur des reconstitution de la structure chromatinienne du LTR *in vitro* (Sheridan et al., 1997; Steger et al., 1998). Les HAT acétylant les histones H3 ou H4 stimulent la transcription du LTR assemblé avec les nucléosomes *in vitro* (Steger et al., 1998). Les HAT augmentent l'accessibilité des facteurs de transcription à la chromatine, suggérant que l'acétylation des histones permet le remodelage du nucléosome nuc-1 et l'activation transcriptionnelle (Sheridan et al., 1997; Steger et al., 1998).

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis d'analyser la cinétique d'acétylation des histones et de recrutement des facteurs de transcription sur le LTR lors de l'activation de la transcription (Lusic et al., 2003). L'acétylation des histones est augmentée lors de l'activation transcriptionnelle par le PMA et est détectée avant l'apparition des ARNm viraux. Les nucléosomes présents sur le LTR ont des profils et des niveaux d'acétylation des histones H3 et H4 différents. L'analyse du recrutement des facteurs de transcription et des coactivateurs a montré que p65, CBP, GCN5 et P/CAF étaient recrutés sur le promoteur en réponse à l'activation transcriptionnelle. L'acétylation des histones H3 et H4 et le recrutement des facteurs CBP, GCN5 et P/CAF se produisent également lors de l'activation de la transcription par Tat.



**Figure 22. Recrutement d'HDAC et d'HAT au niveau du LTR.**

Le nucléosome nuc-1 a un effet inhibiteur sur la transcription du promoteur viral lorsqu'il est maintenu hypoacétylé par des HDAC recrutées *via* des interactions avec des facteurs de transcription se fixant sur le promoteur viral. L'inhibition des HDAC par des HDACi permet le recrutement d'HAT sur le promoteur viral par des interactions avec des facteurs de transcription cellulaires et/ou la protéine virale Tat. L'hyperacétylation de nuc-1 par les HAT permet son remodelage et l'activation de la transcription. D'après Quivy and Van Lint, 2002.

#### 4.2.4. Recrutement des complexes de remodelage de la chromatine par les facteurs de transcription au niveau du LTR

Le remodelage de la chromatine nécessite le recrutement au niveau du LTR de complexes de remodelage ATP-dépendants ou possédant des activités HAT et HDAC. Ces complexes peuvent être recrutés en interagissant avec les facteurs de transcription présents sur le LTR. Plusieurs de ces facteurs, notamment AP1, les récepteurs nucléaires, c-Myb, NF-AT, Ets-1, LEF-1, NF- $\kappa$ B, IRF, Sp1 et Tat, interagissent avec des HAT (pour revue (Quivy and Van Lint, 2002)). Certains facteurs, dont les récepteurs nucléaires, YY1, Sp1, LEF-1 et NF- $\kappa$ B interagissent avec des HDAC (pour revue (Quivy and Van Lint, 2002)). Ces facteurs peuvent également être acétylés ou déacétylés et ceci peut réguler leur fixation sur le LTR. Ces facteurs sont donc de bons candidats pour recruter de façon spécifique des HAT et HDAC au niveau du LTR, régulant ainsi le niveau d'acétylation des histones de nuc-1 et/ou la fixation des facteurs de transcription sur le LTR.

Le fait que l'inhibition de l'activité HDAC soit suffisante pour avoir une activation transcriptionnelle implique que le nucléosome nuc-1 est constitutivement déacétylé par des HDAC ciblées spécifiquement sur le promoteur viral *via* des interactions avec des facteurs répresseurs de transcription (**Figure 22**). Au contraire, l'activation transcriptionnelle conduit à une acétylation des histones de nuc-1 par des HAT recrutées sur le promoteur viral *via* des interactions avec des facteurs activateurs de transcription (pour revue (Quivy and Van Lint, 2002)) (**Figure 22**).

##### 4.2.4.1. Recrutement d'HDAC par YY1

Le facteur de transcription YY1 en coopération avec LSF (« Late SV40 Factor ») inhibe la transcription du VIH-1 (Margolis et al., 1994; Romerio et al., 1997). Le facteur YY1 interagit avec LSF et est recruté sur le promoteur viral par la fixation du facteur LSF au niveau du site d'initiation de la transcription (Coull et al., 2000). Le facteur YY1 interagit avec l'HDAC1 et

permet son recrutement au niveau du LTR (Coull et al., 2000). La répression de la transcription est dépendante de la fixation à l'ADN du facteur LSF et de l'interaction du facteur YY1 avec l'HDAC1 (Coull et al., 2000). Des études d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis de montrer le recrutement de l'HDAC1 sur le nucléosome nuc-1 (He and Margolis, 2002). Le traitement à la TSA ou l'expression de Tat augmente l'acétylation de l'histone H4 et diminue le recrutement de l'HDAC1. Au contraire, le facteur YY1 diminue l'acétylation de l'histone H4 et augmente le recrutement de l'HDAC1 (He and Margolis, 2002). La diminution du recrutement de l'HDAC1 et l'hyperacétylation de nuc-1 corrélient avec une activation transcriptionnelle alors que le recrutement de l'HDAC1 et l'hypoacétylation de nuc-1 corrélient avec la répression de la transcription du LTR (He and Margolis, 2002).

#### **4.2.4.2. Recrutement d'HAT et d'HDAC par NF- $\kappa$ B**

L'interaction du facteur NF- $\kappa$ B avec des HAT et HDAC est nécessaire à la régulation de la transcription dépendante de NF- $\kappa$ B. Le facteur NF- $\kappa$ B interagit avec plusieurs HAT dont p300/CBP, P/CAF et NCoA1 (Sheppard et al., 1999). L'association de NF- $\kappa$ B avec ces complexes co-activateurs est nécessaire à l'activation transcriptionnelle dépendante de NF- $\kappa$ B. Plusieurs études ont également montré que NF- $\kappa$ B interagissait avec des HDAC pour réguler négativement l'expression des gènes (Ashburner et al., 2001).

Les deux sous-unités de l'hétérodimère p50/p65 peuvent être acétylées *in vitro* et *in vivo* (pour revues (Chen and Greene, 2004; Quivy and Van Lint, 2004)). L'acétylation de la sous-unité p50 dans son domaine de fixation à l'ADN par p300/CBP augmente sa fixation sur le promoteur viral et est dépendante de la présence de la protéine Tat (Furia et al., 2002). La sous-unité transactivatrice p65 est acétylée par p300/CBP après induction par le TNF- $\alpha$  et déacétylée par une interaction spécifique avec l'HDAC3. Le niveau d'acétylation de p65

régule son affinité pour l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$  et sa fixation à l'ADN (Chen et al., 2001; Kiernan et al., 2003).

Les HDACi (TSA et NaB) agissent en synergie avec le facteur NF- $\kappa$ B pour activer la transcription du promoteur du VIH-1 (Quivy et al., 2002). Cette synergie est également observée sur la réplication du VIH-1 dans des cellules infectées de façon aiguë ou chronique. Le mécanisme proposé est que les HDACi retardent la réapparition de I $\kappa$ B dans le cytoplasme, qui coïncide avec une prolongation de la présence de NF- $\kappa$ B dans le noyau et de sa fixation à l'ADN (Quivy et al., 2002). Cet effet résulte d'une dégradation des molécules de I $\kappa$ B $\alpha$  néosynthétisées par une activité prolongée de la kinase IKK en réponse aux HDACi (Adam et al., 2003). Le rôle majeur de NF- $\kappa$ B dans l'activation transcriptionnelle du VIH-1 et sa capacité à interagir avec des HAT et des HDAC renforcent son rôle potentiel dans la régulation de la répression de la transcription médiée par nuc-1.

#### **4.2.4.3. Recrutement d'HAT et d'HDAC par Sp1**

Le facteur Sp1 interagit avec p300 qui agit comme un coactivateur de l'activation transcriptionnelle médiée par Sp1 (Suzuki et al., 2000). L'activation transcriptionnelle par les HDACi implique le facteur Sp1 (Xiao et al., 2000) et Sp1 interagit avec des HDAC (Doetzlhofer et al., 1999). Ceci suggère que des HDAC peuvent être recrutées au niveau de nuc-1 *via* les sites Sp1.

#### **4.2.4.4. Recrutement d'HAT par la protéine virale Tat**

La protéine Tat interagit avec plusieurs HAT (p300/CBP, P/CAF, GCN5, cf. § 4.3.4). Le recrutement des ces HAT sur le promoteur viral permet d'augmenter la transactivation du LTR par Tat *via* l'acétylation des histones et de la protéine Tat (cf. § 4.3.5).

#### 4.2.4.5. Recrutement de complexes de remodelage SWI/SNF

Des études récentes ont montré que la sous-unité ATPase BRG1 du complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant SWI/SNF était recrutée au niveau du LTR du VIH-1 lors de l'activation transcriptionnelle (Henderson et al., 2004). Les facteurs ATF-3, JunB et la sous-unité BRG1 sont recrutés au niveau du site AP1 (III) localisé en aval du nucléosome nuc-1 après activation de la transcription par le PMA. L'interaction du facteur ATF-3 avec BRG1 permet le recrutement spécifique du complexe SWI/SNF au niveau du LTR en présence des protéines HMGA1 (Henderson et al., 2004). L'association de BRG1 avec nuc-1 est stabilisée par l'acétylation des histones. Enfin, l'acétylation des histones est nécessaire à l'activation transcriptionnelle dépendante de BRG1 (Henderson et al., 2004). Ces résultats suggèrent que l'acétylation des histones facilite le recrutement du complexe SWI/SNF et que ce complexe est responsable du remodelage du nucléosome nuc-1 nécessaire à l'activation transcriptionnelle du VIH-1.

#### 4.2.5. Influence du site d'intégration de l'ADN proviral sur la transcription

La structure chromatinienne au niveau du site d'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire influence l'expression transcriptionnelle du VIH-1 (pour revues (Bushman, 2002; Wu and Burgess, 2004)). Le processus d'intégration de l'ADN viral a été largement étudié *in vitro* mais le mécanisme moléculaire de la sélection du site d'intégration dans la chromatine *in vivo* est mal défini.

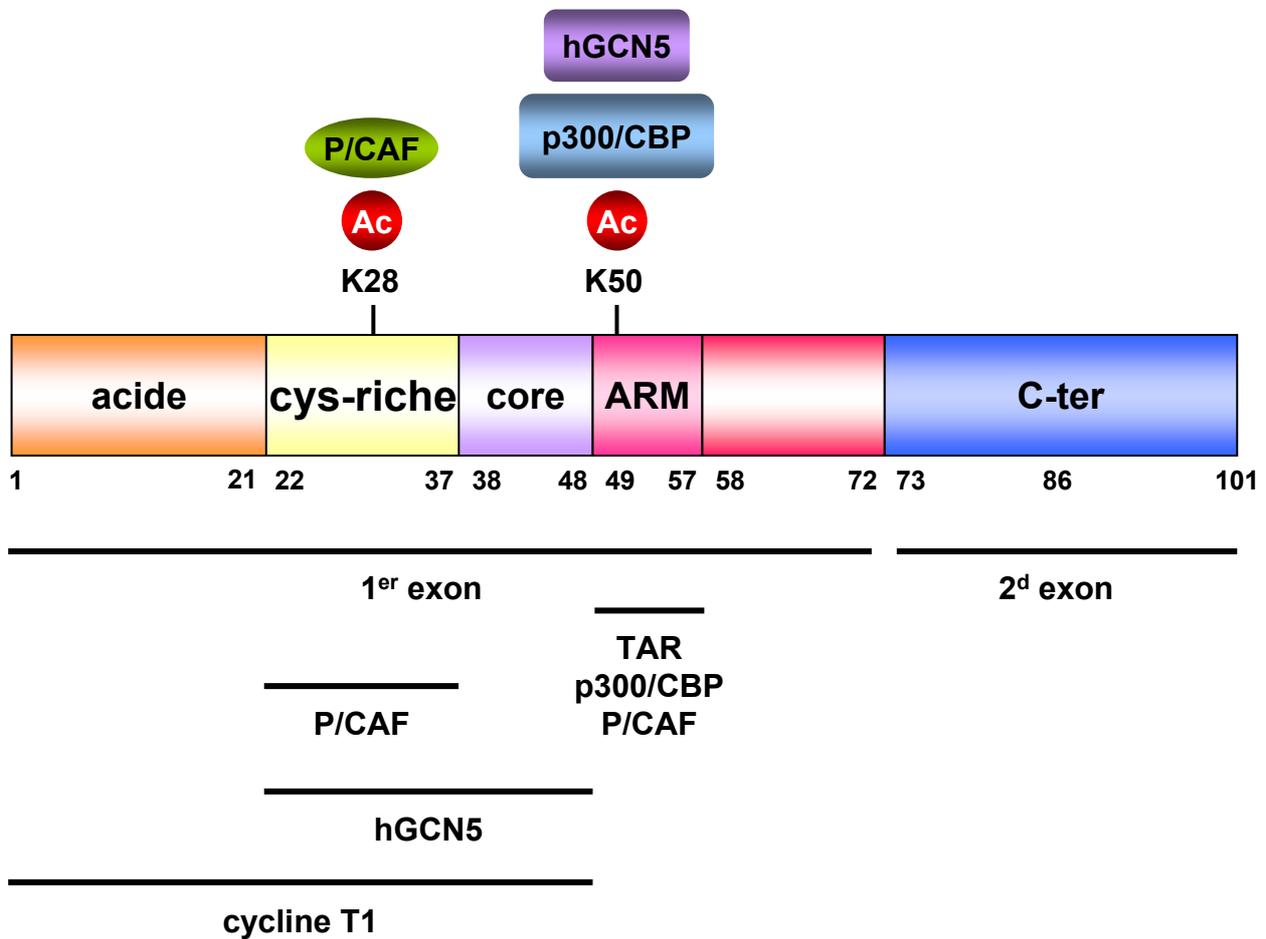
*In vivo*, le génome cellulaire contient des sites préférentiels pour l'intégration des rétrovirus. Les rétrovirus s'intègrent préférentiellement dans des régions d'ADN chromosomique sensibles à la DNase I et qui sont activement transcrites ou répliquées. L'analyse des séquences des sites flanquant l'ADN proviral intégré a montré une intégration préférentielle dans les régions riche en éléments rétrotransposables Alu et L1H (Stevens and Griffith, 1994) et dans les gènes transcriptionnellement actifs et particulièrement ceux activés

en réponse aux infections (Mitchell et al., 2004; Schroder et al., 2002). D'autres analyses des sites d'intégration ont montré que l'intégration était défavorisée dans les régions de chromatine condensée (Taganov et al., 2004) et par les répétitions alphas localisées au niveau de l'hétérochromatine des centromères (Carteau et al., 1998).

Enfin, l'intégrase du VIH-1 interagit avec la sous-unité SNF5/Ini1 du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Kalpana et al., 1994). Cette interaction pourrait permettre cibler le complexe de pré-intégration dans des régions transcriptionnellement actives et ainsi favoriser la réaction d'intégration.

L'activité transcriptionnelle du VIH-1 est influencée par le site d'intégration (Jordan et al., 2001). Jordan et collaborateurs ont utilisé un vecteur rétroviral dérivé du VIH-1 pour construire une librairie de clones de cellules Jurkat contenant une seule copie intégrée du vecteur et ont montré que le niveau de transcription basale variait d'un clone à l'autre, suggérant que l'expression du VIH-1 est influencée par l'environnement chromatinien au niveau du site d'intégration (Jordan et al., 2001). Ils ont également montré l'activation de la transcription de ces clones par la protéine Tat était d'autant plus importante que le niveau de transcription basal du promoteur était faible, suggérant que la transactivation de la transcription par Tat est indépendante de l'environnement chromatinien (Jordan et al., 2001).

La chromatine constitue donc un environnement hétérogène susceptible d'affecter l'activité transcriptionnelle de l'ADN viral intégré. Ainsi, la transcription du promoteur viral est régulée par l'acétylation et la déacétylation des histones et le remodelage de nuc-1 est une étape essentielle à l'activation de la transcription.



**Figure 23. Domaines fonctionnels de la protéine Tat.**

La protéine Tat est constituée de 5 domaines fonctionnels : un domaine N-terminal acide, un domaine riche en cystéine, une région « core », un domaine ARM riche en arginine et un domaine C-terminal. La protéine Tat est un polypeptide de 101 aa codé par 2 exons. Les régions de Tat interagissant avec des protéines cellulaires sont indiquées. Tat peut être acétylée par des protéines acétyltransférases : la lysine en position 50 (K50) est acétylée par p300/CBP et hGCN5, et la lysine en position 28 (K28) est acétylée par P/CAF.

### 4.3. Régulation de la transcription par la protéine Tat

La protéine Tat, *via* son interaction avec l'ARN viral TAR, active la transcription du LTR par des mécanismes moléculaires faisant intervenir des interactions entre Tat et les protéines cellulaires.

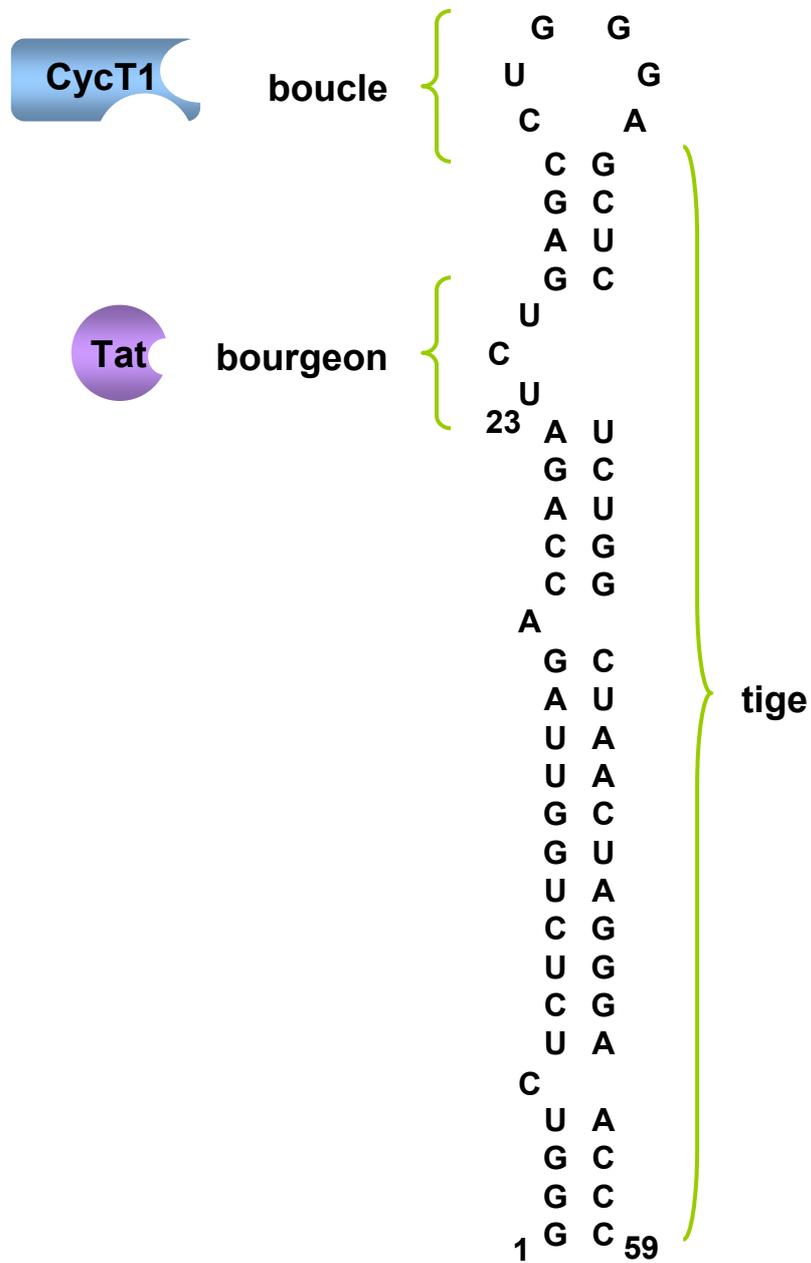
#### 4.3.1. Structure de la protéine Tat

La protéine Tat est un polypeptide de 101 aa, dont les aa 1-72 sont codés par le premier exon et les aa 73-101 sont codés par le deuxième exon. La protéine Tat contient 5 domaines fonctionnels (pour revues (Giacca, 2004; Marcello et al., 2001)) (**Figure 23**) : (1) une région N-terminale, riche en résidus acides (aa 1-21), (2) un domaine riche en résidus cystéine (aa 22-37), (3) une région « core » riche en résidus hydrophobes (aa 38-48), (4) un domaine basique riche en résidus arginine et lysine très conservé parmi les différents isolats (aa 49-57) et (5) une région C-terminale (aa 73-101). Les aa 1-48 constituent le domaine d'activation de la protéine Tat. Le domaine riche en résidus arginine contient le motif RKKRRQRRR (ARM, « Arginine Rich Motif ») qui confère l'interaction avec l'ARN TAR et la localisation nucléaire de la protéine. Enfin, la région C-terminale n'est pas nécessaire pour la fonction transactivatrice de Tat mais a un rôle dans la pathogenèse *in vivo*. Cette région est relativement variable selon les différents isolats, notamment une mutation ponctuelle tronque la protéine à 86 aa dans quelques souches de laboratoire (HXB2, LAI et pNL4-3).

#### 4.3.2. Interaction de la protéine Tat avec l'ARN viral TAR

La protéine Tat active la transcription du VIH-1 *via* l'élément de réponse à la transactivation TAR, une structure ARN « tige-boucle » localisée à l'extrémité 5' de tous les transcrits viraux (nt 1-59) (**Figure 24**) (Berkhout et al., 1989; Dingwall et al., 1989).

La tige de TAR contient un bourgeon de 3 nt (nt 23-25) qui interagit avec le domaine riche en arginine (aa 49-57) de Tat (pour revue (Rana and Jeang, 1999)). La boucle de 6 nt de



**Figure 24. Structure de l'élément de réponse à la transactivation TAR.**

L'ARN viral TAR (nt 1-59) forme une structure « tige-boucle ». Le bourgeon (nt 23-25) riche en pyrimidine interagit avec la protéine Tat. La boucle (nt 30-35) interagit avec la cycline T1.

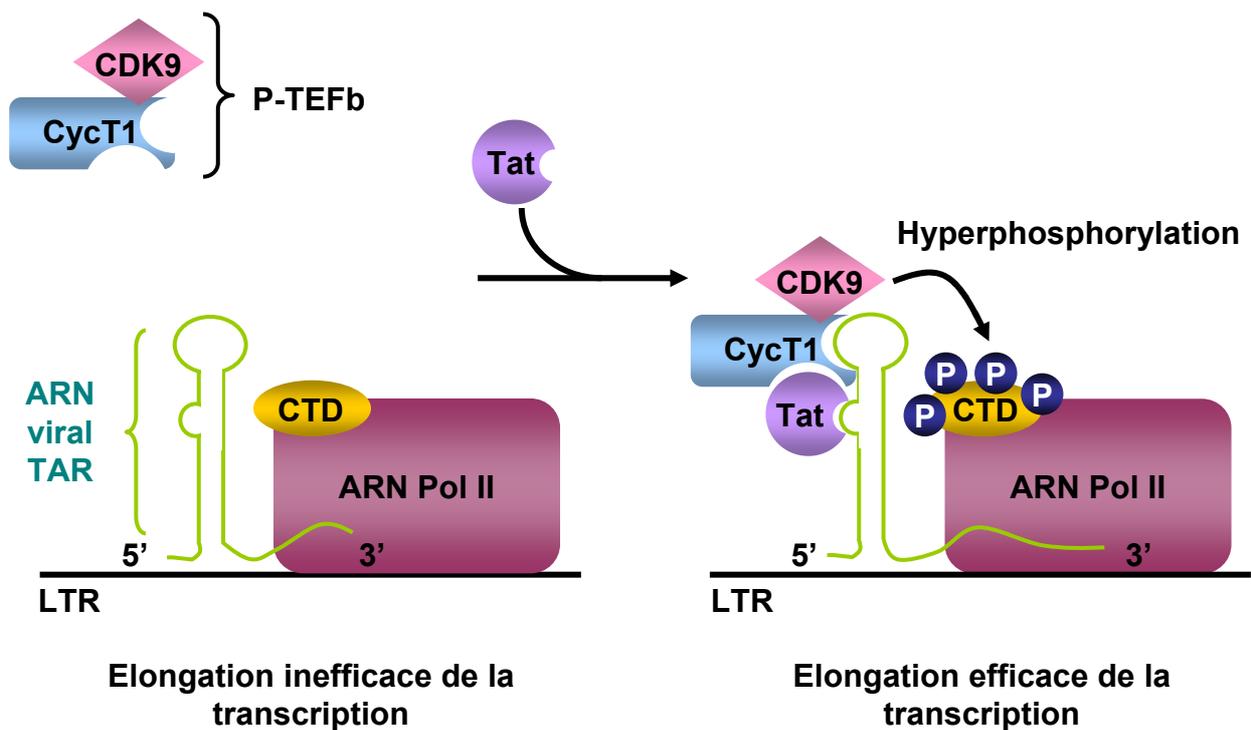
TAR (nt 30-35) n'est pas impliquée dans la liaison à Tat mais est nécessaire à la transactivation (Feng and Holland, 1988). Des protéines cellulaires se fixant sur la boucle de TAR et pouvant agir comme cofacteur de Tat ont donc été recherchées.

#### **4.3.3. Interaction de la protéine Tat avec le complexe P-TEFb**

En absence de Tat, l'élongation de la transcription est inefficace et conduit à la production de transcrits courts (Kao et al., 1987). Dans les cellules, l'élongation de la transcription est dépendante de la processivité de l'ARN polymérase II qui est régulée par des facteurs négatifs (N-TEF, « Negative Transcription Elongation Factor ») et positifs (P-TEF, « Positive Transcription Elongation Factor ») d'élongation de la transcription. Ces facteurs vont modifier l'état de phosphorylation du domaine C-terminal CTD (« C-Terminal Domain ») de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II. L'hyperphosphorylation du CTD par des complexes ayant une activité kinase augmente la processivité du complexe ARN polymérase II et favorise l'élongation de la transcription.

Le mécanisme d'activation de la transcription par la protéine Tat correspond à une augmentation de l'élongation de la transcription (pour revue (Brigati et al., 2003)). Des protéines à activité kinase associées à Tat ont donc été recherchées. Ces études ont permis d'identifier une kinase associée à Tat (TAK, « Tat-Associated Kinase », (Herrmann and Rice, 1995)) capable de phosphoryler le CTD de l'ARN polymérase II. La kinase TAK correspond à une sous-unité du complexe P-TEFb (Mancebo et al., 1997; Zhu et al., 1997). Par la suite, la kinase TAK a été identifiée comme étant la kinase CDK9 (« Cyclin-Dependent Kinase 9 », (Gold et al., 1998)).

Parmi les différentes cyclines interagissant avec CDK9 (cycline T1, cycline T2a, cycline T2b, cycline K), Tat interagit spécifiquement avec la cycline T1 (Wei et al., 1998). En effet, la cycline T1 a été identifiée comme étant le cofacteur de Tat sur l'ARN viral TAR. La cycline T1 interagit de façon coopérative avec le domaine d'activation de Tat (aa 1-48) et la boucle de



**Figure 25. Activation de la transcription par la protéine Tat.**

En absence de Tat, l'élongation de la transcription est inefficace et l'ARN polymérase II transcrit l'ARN viral TAR et arrête la transcription. La protéine Tat interagit avec TAR et recrute le complexe d'élongation de la transcription P-TEFb, constitué de la kinase CDK9 et de la cycline T1 au niveau du promoteur viral. L'interaction entre TAR, Tat et la cycline T1 induit une hyperphosphorylation du domaine C-terminal (CTD) de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II par CDK9. L'hyperphosphorylation du CTD augmente la processivité de l'ARN polymérase II, ce qui conduit à une élongation efficace de la transcription.

TAR (Wei et al., 1998) (**Figure 24**). La kinase CDK9 est donc recrutée sur le promoteur du VIH-1 grâce à l'interaction entre Tat et la cycline T1.

Ainsi, le complexe P-TEFb, composé de la kinase cycline-dépendante CDK9 associée à la cycline T1 et recruté par Tat sur le promoteur LTR *via* l'interaction de Tat avec TAR et la cycline T1, hyperphosphoryle le CTD de l'ARN polymérase II et augmente la processivité de l'élongation transcriptionnelle (**Figure 25**).

#### 4.3.4. Interaction de la protéine Tat avec des protéines acétyltransférases

La protéine Tat interagit avec des protéines cellulaires possédant une activité histone et facteur acétyltransférase (HAT et FAT) : le coactivateur de transcription p300 et son homologue CBP (Hottiger and Nabel, 1998; Marzio et al., 1998), le facteur associé à p300/CBP, P/CAF (Benkirane et al., 1998), le facteur GCN5 (Col et al., 2001), la protéine Tip60 (Yamamoto and Horikoshi, 1997), et le facteur général de transcription TAFII250 (Weissman et al., 1998).

Les conséquences fonctionnelles de ces interactions diffèrent selon les acétyltransférases. Les interactions de Tat avec TAFII250 et Tip60 n'affectent pas la transcription du LTR, mais inhibent la transcription de gènes cellulaires comme les gènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (Weissman et al., 1998) et le gène de l'enzyme superoxyde dismutase Mn-dépendante (Creaven et al., 1999). Au contraire l'interaction de Tat avec p300/CBP, P/CAF et hGCN5 (**Figure 23**) permet d'activer la transcription du LTR. Les protéines p300/CBP interagissent avec le domaine basique ARM de Tat et permettent une augmentation de la transactivation du LTR par Tat (Hottiger and Nabel, 1998; Marzio et al., 1998). L'association de Tat avec P/CAF augmente la synergie de la transcription du VIH-1 par p300/CBP et Tat et le domaine HAT de P/CAF est nécessaire pour l'activation du provirus intégré (Benkirane et al., 1998). L'interaction de Tat avec hGCN5 implique les domaines

HAT et bromodomaine de hGCN5 et les domaines riche en cystéines et « core » (aa 22-48) de Tat et cette interaction augmente la transactivation du LTR par Tat (Col et al., 2001).

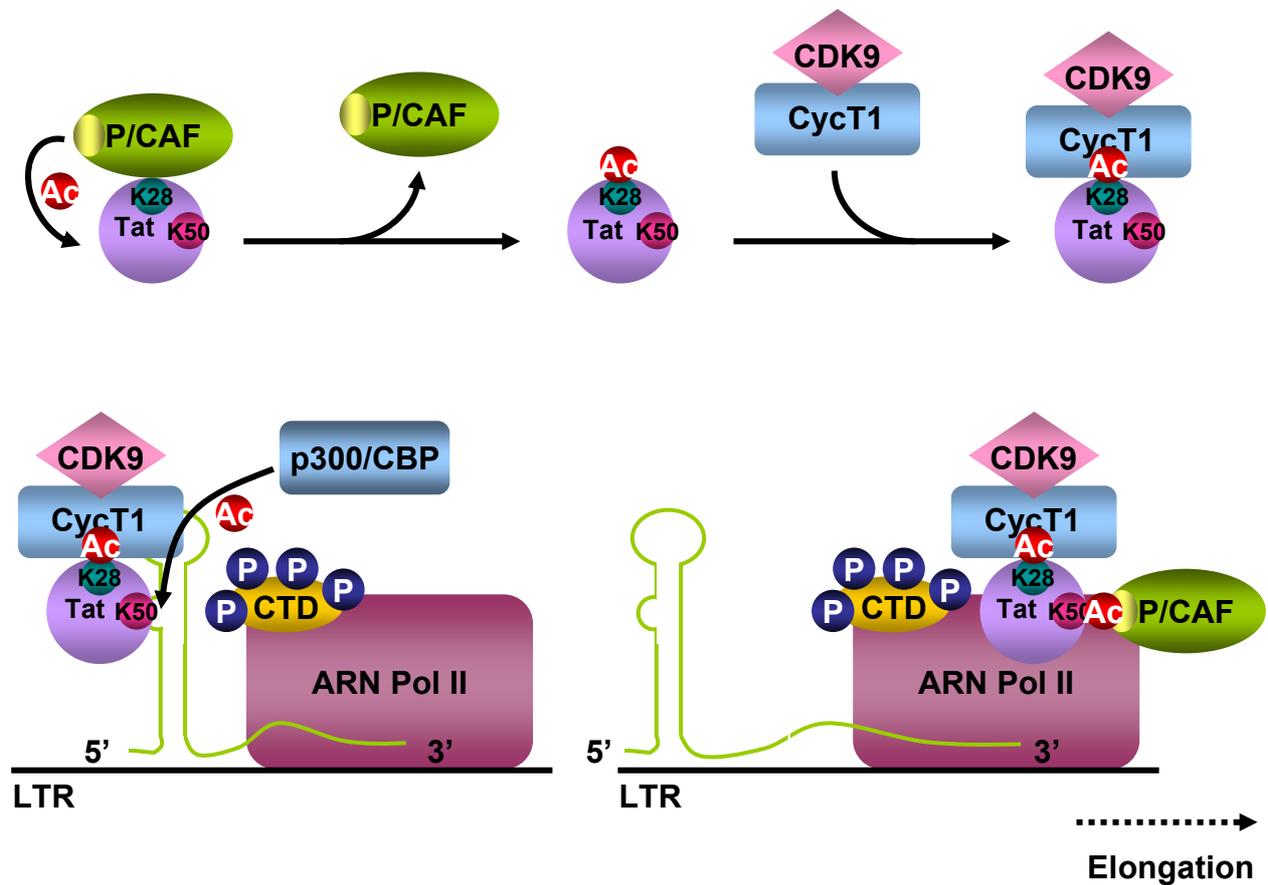
L'interaction de Tat avec des HAT permet d'activer la transcription du LTR mais aussi de réguler l'activité de Tat par acétylation.

#### **4.3.5. Acétylation de la protéine Tat**

La protéine Tat peut être acétylée par les protéines p300/CBP, P/CAF (Deng et al., 2000; Kiernan et al., 1999; Ott et al., 1999) et hGCN5 (Col et al., 2001). Les lysines en position 50 et 51 dans le domaine de fixation à TAR sont acétylées par p300/CBP et hGCN5 et la lysine 28 dans le domaine d'activation est acétylée par P/CAF (Kiernan et al., 1999) (**Figure 23**). Ces acétylations sont associées à l'acquisition de nouvelles propriétés par Tat.

La substitution conservative de la lysine 50 en arginine, qui maintient la charge positive mais empêche l'acétylation par p300, diminue de façon significative l'activation synergique du promoteur VIH-1 par p300 et Tat (Kiernan et al., 1999; Ott et al., 1999). L'acétylation de la lysine 28 par P/CAF augmente la fixation de Tat au complexe P-TEFb alors que l'acétylation de la lysine 50 dissocie la protéine Tat de TAR (Deng et al., 2000; Kiernan et al., 1999). Enfin, la mutation des lysines 28 et 50 en résidus non acétylables inhibe la réplication du VIH-1 (Bres et al., 2002a).

Des études récentes ont montré que Tat acétylée sur la lysine 50 (Tat K50<sup>Ac</sup>) interagissait avec le bromodomaine de P/CAF (Mujtaba et al., 2002). Cette interaction inhibe de façon compétitive la fixation de Tat K50<sup>Ac</sup> sur TAR (Mujtaba et al., 2002) et est nécessaire à la synergie de la transcription du promoteur viral par Tat et PCAF (Dorr et al., 2002). Enfin, il a été montré que P/CAF pouvait interagir avec les aa 20-40 de Tat même lorsqu'elle n'était pas acétylée sur la lysine 50. L'acétylation de la lysine 28 de Tat dissocie cette interaction et l'acétylation de la lysine 50 de Tat permet la formation d'un complexe ternaire Tat-P/CAF-P-TEFb (Bres et al., 2002b).



**Figure 26. Régulation de l'activation de la transcription par acétylation de la protéine Tat.**

P/CAF acétyle Tat sur la lysine 28 (K28) et se dissocie de Tat. L'acétylation de la K28 augmente le recrutement du complexe P-TEFb. La fixation du complexe Tat-P-TEFb à TAR augmente la processivité de l'ARN polymérase II. L'acétylation de la lysine 50 (K50) par p300/CBP permet la dissociation de TAR et la fixation de Tat à P/CAF. Le complexe Tat-P/CAF-P-TEFb s'associe au complexe d'élongation de la transcription. D'après Bres et al., 2002.

La **Figure 26** représente un modèle de régulation de l'activation transcriptionnelle par l'acétylation de Tat. Après acétylation de la lysine 28 par P/CAF, Tat se dissocie de P/CAF et interagit avec le complexe P-TEFb, ce qui permet l'hyperphosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II nécessaire à l'élongation de la transcription. L'acétylation de la lysine 50 de Tat par p300/CBP conduit à l'association de Tat avec P/CAF et à la dissociation de l'ARN TAR qui se produit au début de l'élongation de la transcription. De plus, l'acétylation de la lysine 50 de Tat par p300 dissocie la cycline T1 de l'ARN TAR et permet le transfert de Tat en association avec P/CAF sur le complexe d'élongation de la transcription (Kaehlecke et al., 2003). Ainsi, l'acétylation de la protéine Tat régule la transition entre les phases précoces et tardives de l'élongation de la transcription.

La régulation de la transcription du VIH-1 est donc un processus complexe impliquant des changements dans la structure chromatinienne qui suivent le recrutement spécifique de facteurs de transcription activateurs ou répresseurs au niveau du promoteur. Dans ce contexte, Tat joue un rôle important *via* son interaction avec différents partenaires cellulaires. La régulation complexe de la transcription du VIH-1 permet en partie d'expliquer les mécanismes moléculaires de la latence post-intégrative.

## **5. MECANISMES MOLECULAIRES DE LA LATENCE POST-INTEGRATIVE**

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les mécanismes moléculaires de la latence post-intégrative au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel (pour revues (Lassen et al., 2004a; Williams and Greene, 2005)) : initiation ou élongation inefficace de la transcription du génome viral ou export inefficace vers le cytoplasme des transcrits viraux

codant les protéines virales tardives. L'importance relative de ces mécanismes a été étudiée *in vivo*, et il est apparu que la latence du VIH-1 est un phénomène multi-factoriel qui résulte notamment des différences entre les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes et activées.

## **5.1. Initiation absente ou inefficace de la transcription du génome viral**

### **5.1.1. Inaccessibilité du provirus intégré à la machinerie de transcription cellulaire**

Une des hypothèses est l'intégration du génome viral dans des régions chromosomiques répressives à la transcription (Jordan et al., 2003; Jordan et al., 2001). Jordan et collaborateurs ont analysé les sites d'intégration de l'ADN viral dans des cellules T CD4<sup>+</sup> n'exprimant pas les gènes viraux après infection *in vitro* par le VIH-1 (Jordan et al., 2003). Ils ont montré une intégration préférentielle dans l'hétérochromatine des régions centromériques (Jordan et al., 2003).

Les sites d'intégration dans les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes ont été analysés *in vivo* (Han et al., 2004). L'intégration de l'ADN viral dans des régions centromériques n'a pas été observée. En revanche, l'intégration dans les régions introniques des gènes transcriptionnellement actifs est favorisée dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents (Han et al., 2004). Il semble donc que l'absence de production virale dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents ne soit pas due à une intégration du génome viral dans des régions chromosomiques inaccessibles à la machinerie de transcription cellulaire. Cependant, l'intégration de l'ADN viral dans des gènes transcriptionnellement actifs ne permet pas une infection productive des cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes.

Une étude récente a permis de corréler la compétence du provirus pour la réplication avec son site d'intégration (Lewinski et al., 2005). Les provirus inductibles sont intégrés dans l'hétérochromatine des régions centromériques, dans les régions intergéniques et dans les

gènes cellulaires fortement exprimés (Lewinski et al., 2005). Un modèle d'interférence transcriptionnelle a été proposé pour expliquer la répression de la transcription des provirus intégrés dans les gènes transcriptionnellement actifs (Lassen et al., 2004a; Lewinski et al., 2005). L'interférence transcriptionnelle est observée lorsque la transcription initiée au niveau d'un promoteur en amont inhibe la transcription du promoteur situé en aval. Ce phénomène serait contrecarré dans les cellules T CD4<sup>+</sup> activées en raison d'une concentration suffisante en facteurs de transcription nécessaires à l'expression des gènes viraux.

### **5.1.2. Absence de formes actives des facteurs de transcription nécessaires à l'expression des gènes viraux**

L'absence ou l'inefficacité de l'initiation de la transcription du génome viral dans les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes serait provoquée par un défaut quantitatif ou qualitatif des facteurs de transcription nécessaires à l'expression des gènes viraux, comme NF- $\kappa$ B (Duh et al., 1989; Nabel and Baltimore, 1987) ou NF-AT (Kinoshita et al., 1997; Pessler and Cron, 2004).

L'obtention de lignées cellulaires infectées de façon chronique par le VIH-1, contenant une copie intégrée du génome viral, et pour lesquelles l'expression des gènes viraux peut être activée (Folks et al., 1989; Folks et al., 1987; Folks et al., 1988), a permis de fournir des modèles de latence post-intégrative *in vitro*. Dans ces lignées cellulaires, l'augmentation de l'expression des gènes viraux après traitement au TNF- $\alpha$  est médiée par NF- $\kappa$ B (Duh et al., 1989). Cependant, les lignées cellulaires utilisées comme modèle de latence ne reflètent pas l'état transcriptionnel des cellules quiescentes qui constituent le réservoir du VIH-1 *in vivo*. Dans les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes, le facteur NF- $\kappa$ B est séquestré dans le cytoplasme par I $\kappa$ B, et l'absence de NF- $\kappa$ B dans le noyau empêcherait la transcription des gènes viraux (Bohnelein et al., 1988; Tong-Starksen et al., 1987). Récemment, il a été montré que la protéine Murr1 empêche la dégradation de I $\kappa$ B par le protéasome dans les cellules T CD4<sup>+</sup>

quiescentes (Ganesh et al., 2003). Enfin, l'activation du VIH-1 dans les cellules T CD4<sup>+</sup> implique les facteurs NF-AT et NF-κB (Fortin et al., 2004).

### 5.1.3. Présence de facteurs de transcription répresseurs

La présence dans les cellules infectées de façon latente de facteurs de transcription ayant un effet répresseur pourrait expliquer l'inhibition de la transcription du génome viral. Le facteur de transcription YY1, qui inhibe la transcription du VIH-1 en recrutant l'HDAC1 sur le promoteur viral, pourrait être impliqué (Coull et al., 2000; He and Margolis, 2002) (cf. § 4.2.4.1).

Cependant, l'initiation de la transcription n'est pas totalement inhibée dans lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents isolés de patients infectés par le VIH-1 (Lassen et al., 2004b). La latence post-intégrative n'est donc pas seulement régulée au niveau de l'initiation de la transcription.

## 5.2. Elongation inefficace de la transcription du génome viral

Un autre mécanisme de latence proposé est l'élongation inefficace de la transcription du génome viral en absence de la protéine Tat ou des protéines cellulaires associées à Tat (Adams et al., 1994; Kao et al., 1987).

Il a été montré que des mutations dans le gène *tat* et dans la séquence TAR étaient responsables de la latence dans les modèles de lignées cellulaires (Emiliani et al., 1998; Emiliani et al., 1996). Les variants de la protéine Tat générés *in vivo* pourraient faciliter l'établissement d'une latence post-intégrative (Reza et al., 2003).

Les protéines cellulaires du complexe P-TEFb interagissant avec la protéine Tat (Herrmann and Rice, 1995) sont présentes en très faibles quantités dans les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes (Ghose et al., 2001; Herrmann et al., 1998). L'activation cellulaire augmente l'expression des protéines du complexe P-TEFb et permettrait une élongation efficace de la transcription du génome viral (Ghose et al., 2001).

De plus, la prépondérance de transcrits abortifs dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC, « Peripheral Blood Mononuclear Cell ») et les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes de patients infectés suggère un défaut d'élongation des transcrits viraux (Lassen et al., 2004b; Lin et al., 2003).

### **5.3. Export inefficace des transcrits viraux codant les protéines virales tardives**

L'export inefficace vers le cytoplasme des transcrits viraux codant les protéines virales tardives serait dû à un faible niveau d'expression de la protéine Rev (Pomerantz et al., 1992; Pomerantz et al., 1990). Dans les modèles de lignées cellulaires, l'augmentation de l'expression des gènes viraux est associée à une augmentation des transcrits partiellement ou non épissés codant les protéines virales tardives (Pomerantz et al., 1990). De nombreuses études ont montré que les transcrits viraux exprimés par les cellules infectées de façon latente sont majoritairement des ARNm multi-épissés codant les protéines précoces Tat, Rev et Nef (Pomerantz et al., 1990). Cependant, les ARNm codant les protéines précoces ne sont pas exprimés par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents (Lassen et al., 2004b).

De plus, une récente étude a montré que les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes infectées de façon latente ne contiennent pas de niveaux détectables d'ARN viraux non épissés et multi-épissés, suggérant que la latence est régulée au niveau transcriptionnel plutôt qu'au niveau post-transcriptionnel (Hermankova et al., 2003).

Les mécanismes moléculaires responsables de la latence post-intégrative ne sont donc toujours pas élucidés.

L'identification des réservoirs viraux ainsi que la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement, le maintien et la réactivation de la latence du

VIH-1 sont donc essentiels afin d'élaborer une stratégie efficace pour éliminer le virus des réservoirs cellulaires.

## **6. OBJECTIFS DE MON TRAVAIL DE THESE**

J'ai abordé la thématique de la persistance du VIH-1 dans ses réservoirs cellulaires en m'intéressant à la recherche de nouveaux réservoirs et à l'analyse du contrôle de la latence.

Mon travail de thèse comporte deux axes de recherche :

- le premier vise à étudier l'infection du tissu adipeux humain par le VIH-1 et son rôle potentiel comme nouveau tissu cible pour le virus,
- le deuxième vise à rechercher des gènes cellulaires candidats impliqués dans le contrôle de la latence du VIH-1 dans ses réservoirs cellulaires.

## **MATERIELS ET METHODES**

# ***MATERIELS ET METHODES***

## **1. MATERIELS**

### **1.1. Lignées cellulaires et cellules primaires**

Les lignées humaines de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CEM (ATCC : CRL-2265) et de promonocytes U937 (ATCC : CRL-1593.2) sont un don du Dr. F. Barré-Sinoussi (Institut Pasteur, Paris). Les cellules Raji sont une lignée de lymphocytes B transformés par le virus Epstein-Barr (ATCC : CCL-86). Les lignées de cellules lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> infectées de façon latente ACH2 (Clouse et al., 1989) et J1.1 (Perez et al., 1991) dérivent des cellules CEM et Jurkat, respectivement. Les lignées de cellules promonocytaires infectées de façon latente U1 (Folks et al., 1988) et OM10.1 (Butera et al., 1991) proviennent des cellules U937 et HL-60, respectivement. Les cellules U1, ACH2, OM10.1 et J1.1 ont été obtenues par le National Institutes of Health (NIH) AIDS Research and Reference Reagent Program.

Les cellules HeLa (ATCC : CCL-2) sont des cellules de carcinome utérin humain qui expriment de manière endogène le marqueur CXCR4. Les cellules indicatrices P4.2 (don du Dr. Alizon, Institut Cochin, Paris) (Dragic and Alizon, 1993), issues de cellules HeLa, expriment le gène rapporteur *lacZ* sous le contrôle du promoteur du VIH-1 et le gène codant l'antigène CD4. Ces cellules sont entretenues en présence de néomycine-sulfate (500 µg/mL, Invitrogen). La lignée humaine HEK293 issue de cellules de rein embryonnaire (ATCC : CRL-1573) est un don du Dr. G. Pancino (IP, Paris).

La lignée de préadipocytes PAZ6 (don du Dr. V. Zilberfarb, IC, Paris) provient du tissu adipeux brun et a été établie en culture après expression constitutive de l'antigène T du virus

SV40 (Zilberfarb et al., 1997). Elle possède les mêmes caractéristiques que les cellules adipocytaires après mise en différenciation. Les cellules d'adipocytes primaires proviennent de tissus adipeux sous-cutanés, abdominaux (A2492, A2562, A1832 et A1222) ou mammaires (M2562, M1211 et M1812), prélevés lors d'interventions de chirurgie esthétique. Ces prélèvements sont considérés comme des déchets opératoires et ne rentrent pas dans le champ d'application de la loi Huriet-Sérusclat du 20 Décembre 1988.

## 1.2. Plasmides

Les plasmides pCMV-CD4 (Joliot et al., 2001), pCMV-CCR5 (don du Dr. T. Dragic), et pCMV-CXCR4 (don du Dr. B. Moser) contiennent respectivement le gène *CD4*, le gène *CCR5* et le gène *CXCR4* sous la dépendance du promoteur du cytomégalo virus CMV. Le plasmide pCMV-YFP contient le gène codant la protéine YFP (« Yellow Fluorescent Protein ») sous la dépendance du promoteur CMV (don du Dr. R. Jockers, IC, Paris). Le plasmide pCMV-LacZ contient le gène codant la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur CMV (don du Dr. M. Alizon, IC, Paris). Le plasmide pCMV-Tat contient le gène codant la protéine virale Tat fusionnée à un épitope FLAG<sup>®</sup> sous le contrôle du promoteur CMV (don du Dr. S. Emiliani, IC, Paris). Le plasmide pNCoA3 (pcDNA3.1-AIBI) contient le gène codant le facteur NCoA3 sous le contrôle du promoteur CMV (don du Dr. P.S. Meltzer, NIH, USA). Le plasmide d'expression pIRF8 (pcDNAmycHis-ICSBP) et le plasmide dominant négatif pIRF8-DBD, qui contient le domaine de liaison à l'ADN d'IRF8, sont des dons du Dr. B.Z. Levi (Technion-Israel Institute of Technology, Israel). Le plasmide pIRF1 a été obtenu par clonage du fragment issu de la digestion par *HindIII* / *NotI* du plasmide pHUIRF-3-1 (don du Dr. T. Taniguchi, University of Tokyo, Japon) dans le plasmide pcDNA3.1 (Invitrogen).

Le plasmide pGST-Tat permet l'expression de la protéine Tat (aa 1-86) fusionnée à l'extrémité N-terminale avec la protéine GST (« Glutathione S-transferase ») (NIH) et le plasmide pGEX2T (Amersham Biosciences) permet l'expression de la protéine GST sous le contrôle du promoteur inductible *tac*.

Le vecteur pNL4.3 $\Delta$ env-luc est issu du clone proviral NL4.3 dans lequel le gène *nef*, en partie délété, est remplacé par le gène rapporteur *luciférase* et le gène *env* a été muté entraînant un changement dans le cadre de lecture (Connor et al., 1995). Les plasmides pEnv-LAI et pEnv-ADA8 contiennent respectivement le gène *env* du virus LAI de tropisme X4 et le gène *env* du virus ADA8 de tropisme R5, clonés dans un plasmide d'expression sous le contrôle du promoteur LTR (Dumonceaux et al., 1998). Le plasmide pEnv-VSV-G code la protéine d'enveloppe du VSV-G de tropisme ubiquitaire (don du Dr. P. Sonigo, IC, Paris).

Le plasmide pLTRX-luc contient le gène *luciférase* sous le contrôle de la région promotrice U3-R du VIH-1 LAI (nt -640 à +78) (Hazan et al., 1990). Le plasmide pLTR $\Delta$ TAR-luc correspond au plasmide pLTRX-luc dans lequel la région TAR (nt +38 à +78) a été délétée (Hazan et al., 1990). Les plasmides pISRE-TK-luc et pISREmut-TK-luc ont été obtenus par clonage d'un oligonucléotide de synthèse contenant la séquence ISRE (nt +194 à +223) sauvage (AGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAG) ou mutée (AGGGACTTGCCCGCGCCCGGGAAACCAGAG) du VIH-1 LAI (Van Lint et al., 1997) dans le plasmide pTK-luc contenant le gène *luciférase* sous le contrôle de la région promotrice minimale de la thymidine kinase du virus Herpes simplex (Hazan et al., 1990).

### 1.3. Anticorps

Les anticorps polyclonaux de chèvre anti-NCoA3 (C-20), les anticorps polyclonaux de lapin anti-IRF1 (C-20), les anticorps polyclonaux de chèvre anti-IRF8 (ICSBP, C-19), les anticorps polyclonaux de chèvre anti-cycline T1 (T-18) et les anticorps monoclonaux de

souris anti-GST (B-14) proviennent de Santa Cruz Biotechnology. Les anticorps monoclonaux anti-FLAG<sup>®</sup> M2 de souris sont fournis par Sigma. L'anticorps monoclonal de souris anti-actine (Ab-1) provient de Calbiochem. Les immunoglobulines (Ig) normales non spécifiques de chèvre et de souris proviennent de Santa Cruz Biotechnology.

Les anticorps secondaires utilisés, couplés à la peroxydase (HRP, « Horseradish Peroxidase »), sont des anticorps de chèvre dirigés contre les Ig de lapin (Sigma), des anticorps de mouton dirigés contre les Ig de souris (Amersham Biosciences) et des anticorps de lapin dirigés contre les Ig de chèvre (DakoCytomation).

#### 1.4.ARN interférant (ARNi)

Les ARNi spécifiques du gène *IRF8* ont été commandés chez Invitrogen. Un contrôle négatif contenant un pourcentage en GC moyen et un ARNi contrôle fluorescent couplé FITC (« Fluorescein Isothiocyanate ») ont été utilisés ainsi qu'un contrôle positif correspondant à un ARNi validé spécifique du gène *GAPDH* (Invitrogen). Les séquences des ARNi Stealth<sup>™</sup> doubles brins spécifiques du gène *IRF8* sont :

IRF8-69      5' -UUGCCGGACAUAACAGCUGCUCAAUC-3'  
                   3' -AACGGCCUGUAUGUCGACGAGUUAG-5'

IRF8-70      5' -AAUCUUGCUUGCCAGCGUGUUUCCA-3'  
                   3' -UUAGAACGAACGGUCGCACAAAGGU-5'

IRF8-71      5' -AUAGUAGAAGCUGAUCACCAUCUGG-3'  
                   3' -CCAGAUGGUGAUCAGCUUCUACUAU-5'

## **2. METHODES CELLULAIRES**

### **2.1. Entretien des cellules**

Les cellules non adhérentes sont cultivées dans du milieu RPMI1640 (Invitrogen) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 50 U/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 2 mM de glutamine (Invitrogen). Lorsque la densité cellulaire est importante, les cellules sont diluées de façon à maintenir une concentration d'environ  $10^6$  cellules par mL.

Les cellules adhérentes sont entretenues dans du milieu DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle Medium », Invitrogen) à 4,5 g/L de D-glucose, supplémenté avec 5% de SVF décomplémenté, 50 U/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 2 mM de glutamine (Invitrogen). Lorsque les cellules sont confluentes, le milieu est retiré, les cellules sont rincées au PBS 1X, décrochées par ajout de trypsine (Trypsine/EDTA 1X, Invitrogen) et reprises dans du milieu neuf. Les cellules sont incubées en atmosphère humide contenant 7% de CO<sub>2</sub> à 37°C.

### **2.2. Isolement, culture et mise en différenciation des préadipocytes**

Le tissu adipeux prélevé est découpé puis digéré avec 2 mg/mL de collagénase A (Roche Diagnostics) et 20 mg/mL de sérum albumine bovine (SAB) pendant 2 h à 37°C. Après filtration, les préadipocytes sont isolés par une centrifugation de 10 min à 800 g et les érythrocytes sont lysés par un tampon contenant 154 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM de KHCO<sub>3</sub> et 0,1 mM d'EDTA.

Les cellules primaires de préadipocytes et les cellules de la lignée PAZ6 sont cultivées dans du milieu 50% Ham's F12 et 50% DMEM à 4,5 g/L de D-glucose, supplémenté avec

10% de SVF décomplémenté, 20 mM d'Hepes, 50 U/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 2 mM de glutamine (Invitrogen).

Lorsque les cellules arrivent à confluence, elles sont mises en différenciation en ajoutant au milieu de culture un mélange de différenciation (Mix) contenant 8,5 nM d'insuline, 1 µM de dexaméthasone, 1 µM de pioglitazone, 1 nM de triiodothyronine (T3) et 0,25 mM d'IBMX (« Isobutyl Methyl Xanthine ») (Sigma).

### **2.3. Stimulations cellulaires**

Les cellules sont comptées, centrifugées et le culot cellulaire est repris dans du milieu neuf afin d'obtenir une suspension cellulaire à  $10^6$  cellules par mL. Le NaB est ajouté au milieu à une concentration finale de 10 mM (Sigma), le PMA à une concentration finale de 10 ng/mL (Sigma) et la TSA à une concentration finale de 300 nM (Sigma). Les cellules sont stimulées pendant 24 ou 48 h.

### **2.4. Transfections transitoires**

#### **2.4.1. Co-précipitation au phosphate de calcium**

La veille de la transfection, les cellules sont mises en culture en puits de 35 mm de diamètre ou en boîte de 10 cm de diamètre. Le milieu de culture est remplacé respectivement par 3 ou 10 mL de milieu DMEM neuf, au moins 4 h avant la transfection. Le mélange de transfection est composé, pour un puits de 35 mm, de 150 µL de tampon HBS (25 mM Hepes pH 7,05, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 mM glucose), de 3 µg d'ADN plasmidique et de 9,3 µL de CaCl<sub>2</sub> 2 M ajoutés goutte à goutte sous agitation modérée ; ou pour une boîte de 10 cm, de 500 µL d'HBS, 10 µg d'ADN plasmidique et 31 µL de CaCl<sub>2</sub>. Le

mélange est incubé 20 min à température ambiante. Le précipité est ensuite ajouté directement sur les cellules.

#### **2.4.2. Lipides cationiques (FuGENE6®)**

La veille de la transfection,  $2 \cdot 10^5$  cellules sont mises en culture par puits de 35 mm de diamètre. Le milieu de culture est remplacé par un mélange de 50% de milieu neuf et 50% de milieu conditionné, 4 h avant la transfection. Le mélange de transfection est composé de 94  $\mu\text{L}$  de DMEM sans SVF ni antibiotiques, 6  $\mu\text{L}$  de FuGENE6® (Roche Diagnostics) et de 3  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique. Après 15 à 20 min de précipitation, le mélange est ajouté goutte à goutte sur les cellules.

#### **2.4.3. Nucléofection**

Cinq ou 2 millions de cellules U1 sont centrifugées 5 min à 1000 g puis le culot est repris dans 100  $\mu\text{L}$  de solution Nucleofector™ V (Amaxa Biosystems) contenant 5  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique ou 1 à 2  $\mu\text{M}$  d'ARNi. Les cellules sont placées dans une cuve et transfectées en utilisant le programme V-01 de l'appareil Nucleofector™ (Amaxa Biosystems). Les cellules sont ensuite reprises dans du RPMI-10% SVF et incubées à 37°C.

### **2.5. Mesure de l'activité $\beta$ -galactosidase**

L'activité  $\beta$ -galactosidase est mesurée par la modification du substrat CPRG (« Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside »). Les cellules sont lysées dans un tampon de lyse (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 2,5 mM EDTA, 1,25% NP40, 50 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol), puis du tampon de réaction CPRG (61,9 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 18,1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 6 mM CPRG) est ajouté volume à volume. Une cinétique d'activité  $\beta$ -galactosidase est alors réalisée par mesure de l'absorbance à 575 nm.

## **2.6. Mesure de l'activité luciférase**

L'activité luciférase est mesurée après lyse des cellules dans du tampon LB (25 mM Tris-phosphate pH 7,8, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 15% glycérol). Le lysat est transféré dans un tube Rohren (Sarstedt). La lecture s'effectue sur 5 ou 30 s au luminomètre Berthold (Lumat LB 9507) après ajout de 100 µL d'une solution LB contenant de 0,25 mM de luciférine et 1 mM d'ATP.

## **2.7. Préparation d'extraits protéiques nucléaires et totaux**

Les cellules sont centrifugées 5 min à 1000 g, reprises dans du PBS 1X froid, et centrifugées 3 min à 3000 g à 4°C. Pour la réalisation des extraits nucléaires, le culot cellulaire est repris dans du tampon I (50 mM Tris pH 7,9, 10 mM KCl, 10% glycérol, 1 mM EDTA, 0,4% NP40, 1% cocktail d'inhibiteurs de protéases Sigma). Après une centrifugation de 3 min à 3000 g à 4°C, le culot de noyaux est repris dans du tampon II (20 mM Hepes pH 7,9, 400 mM NaCl, 10 mM KCl, 20% glycérol, 1mM EDTA, 1% cocktail d'inhibiteurs de protéases Sigma), incubé 20 min à 4°C puis centrifugé 10 min à 15000 g à 4°C. Le surnageant (extrait nucléaire) est récupéré et la concentration en protéines est déterminée.

Pour la réalisation des lysats totaux, le culot cellulaire est repris dans du tampon de lyse (20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycérol, 0,1% NP40, 1mM DTT, 1% cocktail d'inhibiteurs de protéases Sigma), incubé 15 min à 4°C puis centrifugé 10 min à 15000 g à 4°C. Le surnageant (lysat total) est récupéré et la concentration en protéines est déterminée.

Le dosage des protéines est réalisé par la technique de Bradford. Un µL d'extrait protéique est ajouté à un mélange de 250 µL de réactif Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) et d'1 mL d'eau. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 595 nm.

## **2.8. Production de virus pseudotypés**

Les virus pseudotypés sont obtenus après co-transfection au chlorure de calcium de cellules HEK293 du plasmide proviral pNL4.3 $\Delta$ env-luc et d'un plasmide codant pour une protéine d'enveloppe, en boîte de 10 cm de diamètre. Après 48 h de transfection, les surnageants contenant les virus sont prélevés, centrifugés, filtrés sur membrane de 0,45  $\mu$ m de diamètre, aliquotés et congelés à -80°C. Les virus ainsi obtenus sont titrés par dosage de la protéine p24 et testés en infection sur des cellules cibles.

## **2.9. Quantification de la production virale**

La quantification de la production virale se fait par dosage de la protéine p24 des surnageants à l'aide d'un test ELISA. On utilise le kit « HIV-1 p24 Antigen Assay » de Coulter.

# **3. METHODES MOLECULAIRES**

## **3.1. Analyse des interactions protéiques**

### **3.1.1. « GST pull-down »**

Les protéines de fusion GST sont produites dans des bactéries BL21 recombinantes contenant le plasmide pGST-Tat. Après induction de l'expression pendant 4 h à 30°C avec 0,1 mM d'IPTG (« Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside »), les bactéries sont centrifugées puis incubées 1 h à 4°C dans un tampon de lyse (20 mM Hepes pH 7,9, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, 17% glycérol, 1 mM DTT) puis soniquées. Après une centrifugation de 10 min à 10000 g, le surnageant contenant la protéine de fusion GST est incubé avec des billes de Glutathion Sepharose 50% (Amersham Biosciences) pendant 1 h à 4°C. Les extraits protéiques totaux (2

mg) sont alors incubés toute la nuit à 4°C sous agitation en présence des billes de Glutathion Sepharose auxquelles sont fixées les protéines de fusion GST. Les billes sont ensuite rincées 5 fois avec du tampon de lyse puis reprises dans 20 µL de tampon de Laemmli 2X (130 mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 0,02% bleu de bromophénol, 20% glycérol, 10% β-mercaptoéthanol).

### **3.1.2. Immunoprécipitation**

Les extraits protéiques totaux (2 mg) sont incubés toute la nuit à 4°C en présence de 2 µg d'anticorps sous agitation. La protéine G Sepharose 50% (Amersham Biosciences) est ajoutée sur les complexes Ag-Ac pendant 4 h à 4°C. Les billes sont ensuite rincées 5 fois avec du tampon de lyse puis reprises dans 20 µL de tampon de Laemmli 2X.

## **3.2. Analyse des interactions ADN-protéines par « DNA pull-down »**

Cent pmoles d'oligonucléotides biotinylés double brin sont incubés avec 1 mg de billes magnétiques couplées à la Streptavidine (Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal) pendant 30 min, puis les billes sont rincées et reprises dans du tampon de liaison (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 75 mM KCl, 1mM DTT, 10% glycérol). Vingt cinq pmoles d'oligonucléotides couplés aux billes magnétiques sont alors mélangés à 100 µg d'extraits nucléaires dans 25 µL de tampon de liaison avec 1µg de SAB et 1µg de poly-dIdC pendant 45 min à 4°C. Des expériences de chasse spécifique et non spécifique sont réalisées avec un excès d'oligonucléotide non biotinylé sauvage ou mutant. Les complexes ADN-protéines sont récupérés par aimantation, puis les billes sont rincées et reprises dans 20 µL de tampon de Laemmli 2X.

### **3.3.Électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et immun- empreinte (Western-Blot)**

Les échantillons protéiques additionnés de tampon de Laemmli sont dénaturés 5 à 10 min à 95°C et sont déposés sur un gel d'acrylamide/bis-acrylamide 37.5-1 de concentration variable et séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes. La migration s'effectue en tampon de migration 1X (3 g/L Tris/base, 14,4 g/L glycine, 1 g/L SDS) à 110 V. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad) durant la nuit à 30 V et à 4°C en tampon de transfert 1X (3 g/L Tris/base, 14,4 g/L glycine, 20% éthanol). La membrane est alors colorée au rouge ponceau, puis rincée au PBS 1X. Les sites non spécifiques sont bloqués dans du PLT (PBS 1X, 5% lait écrémé Régilait, 0,05% Tween 20).

L'analyse des protéines est réalisée après incubation de la membrane avec une dilution d'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt, rinçages, incubation avec un anticorps secondaire couplé à la HRP et rinçages. La révélation se fait par mise en contact de la membrane avec une solution d'ECL (« Enhanced Chemiluminescence », Amersham Biosciences) pendant 1 min puis exposition d'un film photographique.

### **3.4.Extraction d'ADN génomique**

L'extraction d'ADN génomique (ADNg) est réalisée en utilisant le kit « QIAamp DNA Mini kit » (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Le culot cellulaire est repris dans 200 µL de PBS et lysé avec 200 µL de tampon AL, puis la protéase est ajoutée et le mélange est incubé 10 min à 65°C. Après ajout de 200 µL d'éthanol, le mélange est déposé sur colonne et après plusieurs lavages, l'ADNg est élué par du tampon AE.

### **3.5.Extraction d'ARN**

Les ARN sont extraits soit par utilisation du Trizol® (Invitrogen), soit par utilisation du kit « RNeasy Mini Kit » (Qiagen). Dans la première technique, les cellules sont lysées par l'addition de Trizol®, puis les ARN sont extraits au phénol/chloroforme et concentrés par une précipitation alcoolique. Dans la deuxième technique, les cellules sont lysées dans un tampon RLT contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol, le lysat est clarifié sur une colonne « QIAshredder » et de l'éthanol est ajouté. Le mélange est déposé sur colonne et un traitement à la DNase I est réalisé selon les recommandations du fabricant. Après plusieurs lavages, l'ARN est élué. La qualité et la concentration des ARN sont estimées par mesure des absorbances à 260 et 280 nm au spectrophotomètre (Pharmacia Biotech).

### **3.6.Hybridation sur micropuces**

Les ARN totaux extraits des cellules U1 et ACH2 stimulées ou non par le NaB pendant 24 h ont été envoyés au Dr. C. Thibault à la plate-forme Affymetrix de l'IGBMC de Strasbourg pour amplification, marquage et hybridation sur les micropuces U-133A (Affymetrix) contenant 22283 spots d'oligonucléotides. Les résultats sont analysés avec le logiciel Mas5.0 (Affymetrix) et interprétés avec les logiciels Data Mining Tool (Affymetrix) et Microsoft Excel. Pour les analyses individuelles, un gène est considéré comme exprimé si la valeur p est inférieure à 0,048. Pour les analyses comparatives, un gène est surexprimé si le rapport des intensités d'hybridation en  $\log_2$  est supérieur ou égal à 1 et un gène est sous-exprimé si le rapport des intensités d'hybridation en  $\log_2$  est inférieur ou égal à -1. Les changements d'expression des gènes sont considérés comme significatifs lorsque la valeur p est  $\leq 0,0001$  pour les gènes surexprimés et la valeur 1-p est  $\geq 0,9999$  pour les gènes sous-exprimés.

**Tableau 1. Séquences des amorces et des sondes utilisées en PCR semi-quantitative (A), en PCRq (B) et en RT-PCRq (C).**

<b>A</b>	<b>Gènes</b>	<b>Amorces <sup>a</sup></b>	<b>Séquences (5' → 3')</b>
	<i>CD4</i>	CD4 S CD4 AS	GAAATCAGGGCTCCTTCTTAACTAA GTCAGAGTTGGCAGTCAATCC
	<i>CXCR4</i>	CXCR4 S CXCR4 AS	TTTAAATTAAGCTTGCAAAGTGACGCCGAGGGCCTGAG TTTAAATCTAGAAAG CAATAAAAACGTACAATATTGGTC
	<i>CCR5</i>	CCR5 S CCR5 AS	AAAAAATCAATGTGAAGCAAATCG GAAGGAAAAACAGGTCAGAGATGG
	<i>cyclophiline A</i>	Cyclo S Cyclo AS	AGCACTGGAGAGAAAGGATT GGAGGGAACAAGGAAAACAT
<b>B</b>	<b>Gènes</b>	<b>Amorces <sup>a</sup></b>	<b>Séquences (5' → 3')</b>
	<i>NCoA3</i>	NCoA3 S NCoA3 AS	CTTTGGGCATTTCCTGAACTTGTC GCCTCATCACCCGCAGCAC
	<i>IRF8</i>	IRF8 S IRF8 AS	GGAGTGCGGTCGCTCTGAAA GTCGTAGGTGGTGTACCCCGTCA
	<i>GAPDH</i>	GAPDH S GAPDH AS	GGGAAACTGTGGCGTGAT GGAGGAGTGGGTGTGCTGTT
	<i>cyclophiline A</i>	Cyclo S Cyclo AS	AGTGGTTGGATGGCAAGC GATTCTAGGATACTGCGAGCAA
<b>C</b>	<b>Gènes</b>	<b>Amorces <sup>a</sup> et sondes <sup>b</sup></b>	<b>Séquences (5' → 3')</b>
	<i>gag</i>	Gag S Gag AS Gag TM *	GACGCTCTCGCACCCATCTC CTGAAGCGCGCACGGCAA TAGCCTCCGCTAGTCAAATTTTTGGCGTX <sup>c-d</sup>
	<i>cyclophiline A</i>	Cyclo S Cyclo AS Cyclo FL * Cyclo LC *	CATCTGCACTGCCAAGACTGAG AGGGAACAAGGAAAACATGGAA CCTCCACCCCATTTGCTCGCAGTA <sup>e</sup> CCTAGAATCTTTGTGCTCTCGCTGCAGT <sup>f</sup>

<sup>a</sup> S : amorce sens, AS : amorce antisens.

<sup>b</sup> \* : sonde.

<sup>c</sup> X : groupe 5-carboxytetramethylrhodamine.

<sup>d</sup> Modifié en 5' par la 6-carboxyfluorescéine et phosphorylé en 3'.

<sup>e</sup> Modifié en 3' par la fluorescéine.

<sup>f</sup> Modifié en 5' par le fluorophore LC red 640 et phosphorylé en 3'.

### **3.7. Transcription inverse et amplification par polymérisation en chaîne (RT-PCR, « Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction »)**

#### **3.7.1. Transcription inverse**

La transcription inverse est réalisée sur 1 µg d'ARN total, traité par 1 U de DNase I (DNase I Amplification Grade, Invitrogen) pendant 15 min dans un volume final de 10 µL. L'ARN est incubé en présence de 200 ng d'oligo-dT et de 0,5 mM de dNTP pendant 10 min à 65°C. La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée en présence de tampon 1X First-Strand, de 10 mM de DTT, de 40 U d'inhibiteur de RNase (RNaseOUT™, Invitrogen), et de 200 U de transcriptase inverse de MoMLV (SuperScript™ II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase, Invitrogen), 50 min à 42°C puis 15 min à 70°C.

#### **3.7.2. PCR semi-quantitative**

A un dixième des ADNc produits par RT sont ajoutés 200 ng de chaque amorce spécifique, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de dNTP et 2,5 U de Taq DNA Polymérase (Invitrogen). L'amplification est réalisée grâce à un thermocycleur (PTC-200 DNA Engine, MJ Research) avec le programme suivant : 1 cycle de 10 min à 94°C, 25 cycles composés d'une dénaturation de 30 s à 94°C, d'une hybridation de 30 s à la température d'hybridation des amorces (54°C pour les PCR *CD4* et *cyclophiline A* et 57°C pour les PCR *CXCR4* et *CCR5*) et d'une élongation de 30 s à 72°C, suivi d'un dernier cycle de 10 min à 72°C. Les séquences des amorces utilisées sont données dans le **Tableau 1A**.

#### **3.7.3. PCR quantitative (PCRq)**

Les ARNm sont quantifiés avec l'appareil Light Cycler (Roche Diagnostics). Les PCRq sont réalisées sur 1/10 des ADNc synthétisés dans un mélange réactionnel de 20 µL contenant le tampon 1X Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics), 4 mM de MgCl<sub>2</sub> et 500 nM de chaque amorce. Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel

Oligo 6 et les séquences sont données dans le **Tableau 1B**. Les étapes de la PCRq sont : une dénaturation de 10 min à 95°C suivie de 45 cycles de 10 s à 95°C, 5 s à la température d'hybridation des amorces (55°C pour les PCRq *NCoA3* et *cyclophiline A*, 59°C pour la PCRq *IRF8* et 64°C pour la PCRq *GAPDH*), et 20 s à 72°C. Une courbe de fusion est réalisée à la fin de la PCR afin de vérifier que chaque couple d'amorce amplifie un seul produit. Les réactions sont réalisées en double et les quantifications sont déterminées en référence à une courbe standard préparée en diluant en série un produit de PCR contenant la séquence cible. Les résultats sont analysés en utilisant la méthode « second-derivative-maximum » fournie par le logiciel de quantification du Light Cycler (version 3.5). L'expression des gènes est normalisée par rapport à l'expression du gène *cyclophiline A*.

#### 3.7.4. RT-PCR quantitative (RT-PCRq)

Les RT-PCRq sont réalisées sur 2 µL d'ARN dans un mélange réactionnel de 20 µL contenant le tampon 1X Light Cycler FastStart RNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostics), 3,25 mM de Mn(OAc)<sub>2</sub>, 500 nM de chaque amorce, et 200 nM de sonde « TaqMan » (RT-PCRq *gag*) ou 200 nM de chaque sonde d'hybridation (RT-PCRq *cyclophiline A*). Les séquences des amorces et des sondes sont données dans le **Tableau 1C**. Les étapes de la RT-PCRq sont : une transcription inverse de 25 min à 61°C, une dénaturation de 2 min à 95°C suivie de 45 cycles de 10 s à 95°C et 40 s à 60°C pour la RT-PCRq *gag* ou de 45 cycles de 1 s à 95°C, 10 s à 56°C et 15 s à 72°C pour la RT-PCRq *cyclophiline A* (Brussel and Sonigo, 2004). Les réactions sont réalisées en double et les quantifications sont déterminées en référence à une courbe standard préparée en diluant en série un ARN transcrit *in vitro* contenant la séquence cible (don du Dr. A. Brussel, IC, Paris) (Brussel and Sonigo, 2004). Les résultats sont analysés comme décrit précédemment.

## **RESULTATS**

## **RESULTATS**

### **1. INFECTION DU TISSU ADIPEUX HUMAIN PAR LE VIH-1 : UN NOUVEAU TISSU CIBLE ?**

#### **1.1.Introduction**

##### **1.1.1. Tissu adipeux**

Le tissu adipeux blanc est un organe biologiquement très actif ayant comme rôle la régulation de l'homéostasie énergétique. Outre son rôle dans le stockage des lipides, le tissu adipeux s'avère être un tissu endocrine (Kershaw and Flier, 2004). Les adipocytes sont en effet des cellules sécrétrices de nombreuses molécules impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique et la réponse inflammatoire. Les adipocytes sécrètent des hormones appelées « adipocytokines » comme la leptine, mais aussi des cytokines comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 et des chimiokines pouvant avoir un rôle autocrine et paracrine (Kershaw and Flier, 2004). En effet, les adipocytes expriment des récepteurs aux  $\alpha$  et  $\beta$ -chimiokines (Gerhardt et al., 2001). De plus, les adipocytes partagent des propriétés fonctionnelles et antigéniques avec les cellules de la lignée monocytes/macrophages (Cousin et al., 1999).

La majorité des patients infectés par le VIH-1 et sous HAART développent un syndrome de lipodystrophie périphérique caractérisé par une redistribution anormale du tissu adipeux associée à des désordres métaboliques tels qu'une hyperlipidémie et une résistance à l'insuline pouvant conduire à un diabète de type II (Gougeon et al., 2004). Ce syndrome est dû notamment à l'action des molécules antirétrovirales sur le processus de différenciation des préadipocytes en adipocytes qui implique une activation séquentielle de facteurs de

transcription régulant l'expression de gènes spécifiques des adipocytes (MacDougald and Mandrup, 2002). Les effets cytopathogènes du VIH-1 pouvant causer une déplétion des cellules infectées, il est essentiel de savoir si le tissu adipeux peut être infecté par le VIH-1.

De plus, l'ampleur des résurgences de la charge virale observées lors des interruptions du traitement par HAART suggère que le VIH-1 persiste dans des réservoirs viraux encore non caractérisés (Blankson et al., 2002). L'identification de ces réservoirs est essentielle afin d'élaborer une stratégie efficace pour éliminer le virus de l'organisme. Il est donc nécessaire de déterminer si le tissu adipeux peut constituer un nouveau réservoir pour le VIH-1.

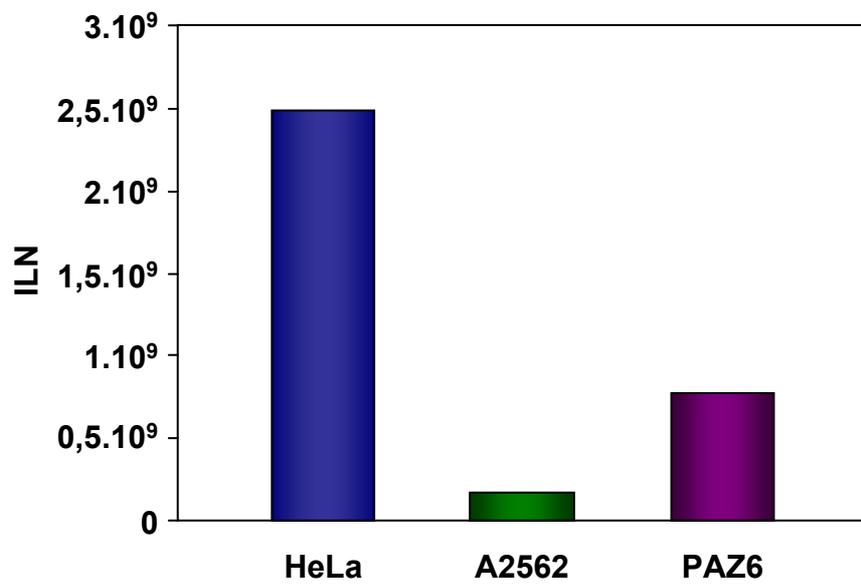
### **1.1.2. Travaux antérieurs**

Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont montré que les adipocytes expriment le récepteur CD4 et les récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR5 et que les préadipocytes peuvent être infectés mais de façon peu efficace par le VIH-1 (Hazan et al., 2002).

L'expression des récepteurs du VIH-1 a été analysée sur des cultures primaires de préadipocytes humains différenciés *in vitro* en adipocytes matures. Des expériences de RT-PCR semi-quantitative et d'immunocytochimie ont montré que les cellules du tissu adipeux expriment les récepteurs d'entrée du VIH-1. L'infection de ces cellules par le VIH-1 a donc été étudiée. Des préadipocytes primaires ont été infectés avec des souches virales de différents tropismes. La détection d'ADN viral après infection avec des virus X4 ou R5 démontre qu'il y a eu entrée et transcription inverse. Cependant, l'infection des préadipocytes avec de fortes doses de virus ne permet qu'une faible production virale et ce uniquement après infection avec des virus X4.

### **1.1.3. Objectifs**

Nous avons voulu savoir si cette faible production virale était due à une faible efficacité d'infection (blocage au niveau de l'entrée virale du à un niveau insuffisant d'expression des récepteurs), et/ou à une faible efficacité de réplication virale (blocage post-entrée, à une étape



**Figure 27. Expression du plasmide pLTR-luc dans des préadipocytes.**

Des préadipocytes humains primaires (A2562), des cellules PAZ6 et des cellules HeLa ont été co-transfectés avec 2 µg de plasmide pLTR-luc et 1 µg de plasmide pTat. L'activité luciférase a été mesurée 24 h post-transfection. ILN : Index Luciférase Normalisé.

pré- ou post-intégration). L'identification d'un blocage au niveau du cycle de réplication du VIH-1 dans les cellules du tissu adipeux pourrait remettre en question son rôle potentiel comme nouveau tissu cible pour le virus.

## 1.2. Expression du plasmide pLTR-luc dans des préadipocytes

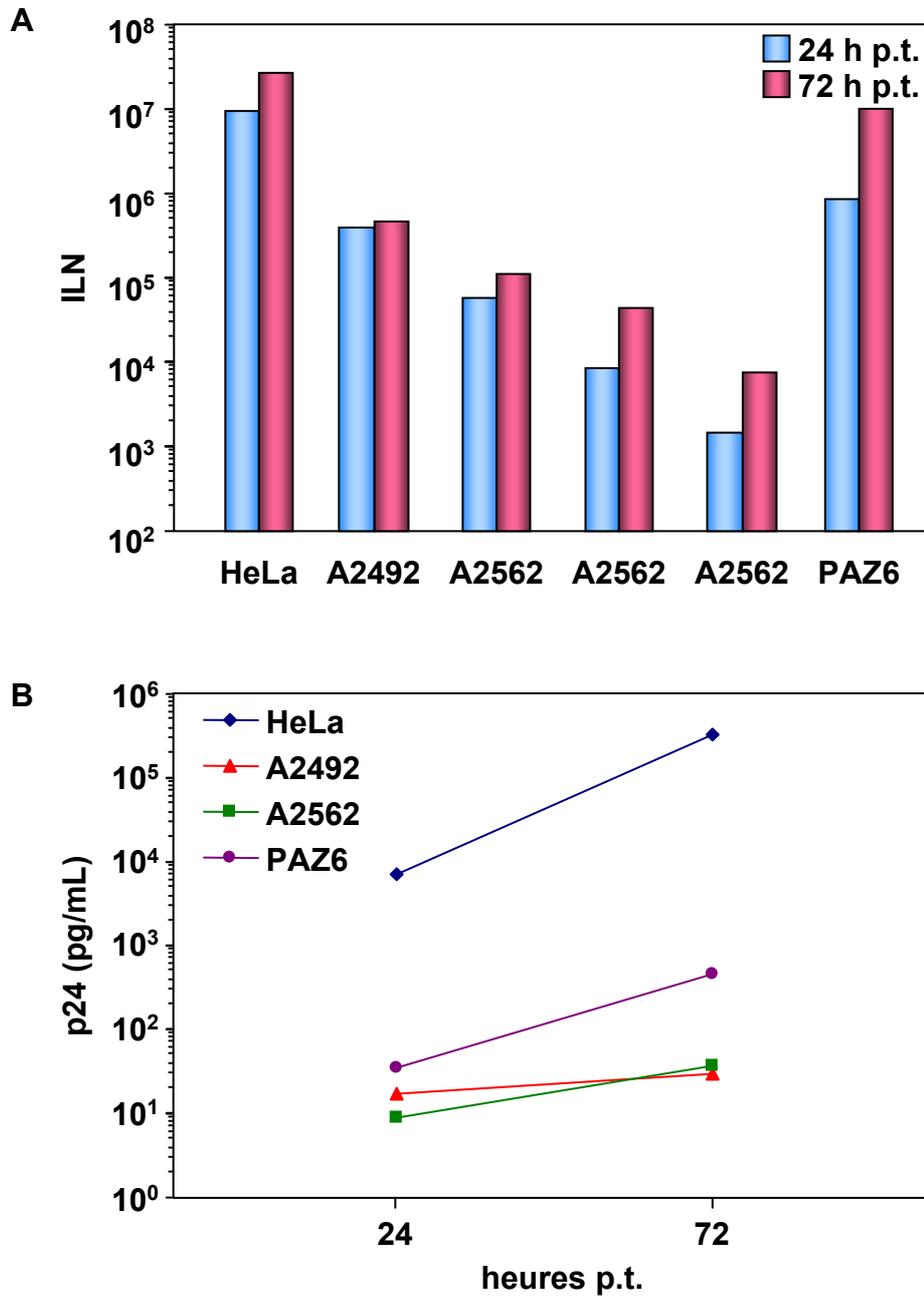
Afin de déterminer si les cellules du tissu adipeux peuvent permettre la transcription du VIH-1, nous avons transfecté des préadipocytes avec un plasmide contenant le gène rapporteur *luciférase* sous le contrôle du promoteur viral.

Des préadipocytes humains primaires A2562, des cellules de la lignée PAZ6 et des cellules HeLa ont été co-transfectés de façon transitoire avec le plasmide pLTR-luc et un plasmide permettant l'expression de la protéine virale transactivatrice Tat. La transcription à partir du LTR a été analysée par mesure de l'activité luciférase 24 h post-transfection (p.t.) (**Figure 27**). L'activité luciférase obtenue 24 h p.t. est de  $2,5 \cdot 10^9$  ILN pour les cellules HeLa,  $1,7 \cdot 10^8$  ILN pour les préadipocytes A2562 et  $7,7 \cdot 10^8$  ILN pour les cellules PAZ6 (**Figure 27**).

Ces résultats montrent que la transcription à partir du promoteur viral et en présence de la protéine Tat est efficace dans les préadipocytes humains primaires et dans les cellules de la lignée PAZ6.

## 1.3. Expression de l'ADN proviral pNL4.3 $\Delta$ env-luc dans des préadipocytes

Afin de déterminer si les cellules du tissu adipeux peuvent permettre la réplication du VIH-1, et plus particulièrement les étapes post-intégration, nous avons transfecté des préadipocytes avec un provirus contenant le gène rapporteur *luciférase*. La transfection directe de l'ADN proviral dans les préadipocytes permet de s'affranchir des étapes précoces du cycle viral.

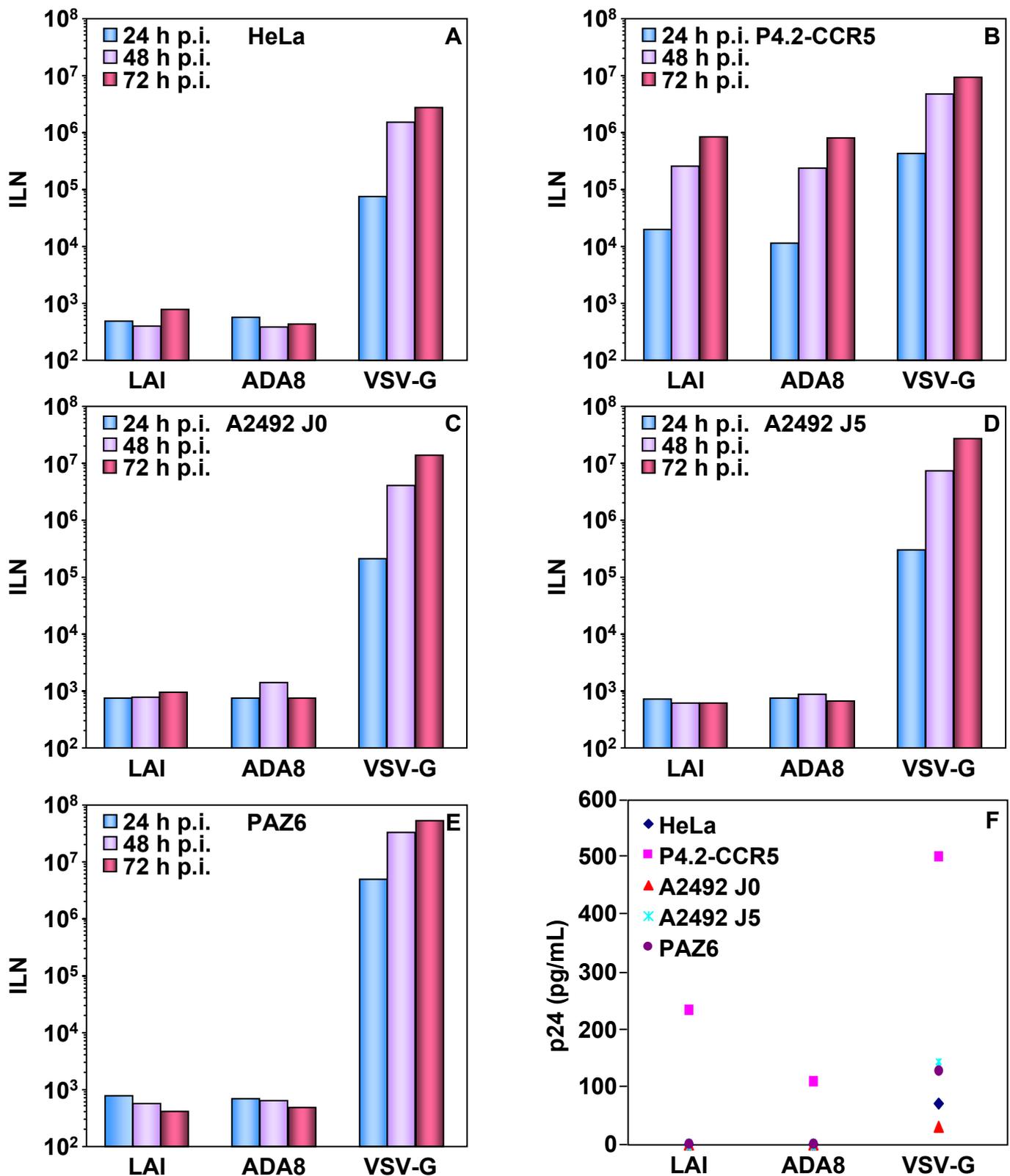


**Figure 28. Expression de l'ADN proviral pNL4.3Δenv-luc dans des préadipocytes.**

Des préadipocytes humains primaires (A2492 et A2562), des cellules PAZ6 et des cellules HeLa ont été transfectés avec 3 µg de plasmide proviral pNL4.3Δenv-luc. L'expression de l'ADN proviral a été analysée par mesure de l'activité luciférase (A) et de la production de protéine p24 (B) 24 et 72 h post-transfection (p.t.). ILN : Index Luciférase Normalisé.

Des préadipocytes primaires A2492 et A2562, des cellules PAZ6 et des cellules HeLa ont été transfectés avec le plasmide proviral pNL4.3- $\Delta$ env-luc et l'expression de l'ADN proviral a été analysée par mesure de l'activité luciférase 24 et 72 h p.t. (**Figure 28A**). L'activité luciférase des préadipocytes provenant de 2 biopsies différentes transfectés avec le plasmide pNL4.3 $\Delta$ env-luc varie de  $1,5 \cdot 10^3$  à  $4,5 \cdot 10^5$  ILN 24 h p.t. et de  $8 \cdot 10^3$  à  $5 \cdot 10^5$  ILN 72 h p.t. (**Figure 28A**). Les activités luciférase des cellules PAZ6 transfectées avec le plasmide pNL4.3 $\Delta$ env-luc sont de  $9,6 \cdot 10^5$  ILN 24 h p.t. et de  $1,1 \cdot 10^7$  ILN 72 h p.t. (**Figure 28A**). Les activités luciférase des cellules HeLa transfectées avec le plasmide pNL4.3- $\Delta$ env-luc sont de  $1,1 \cdot 10^7$  ILN 24 h p.t. et de  $3,1 \cdot 10^7$  ILN 72 h p.t. (**Figure 28A**). Les activités luciférase obtenues pour les préadipocytes sont environ  $1 \cdot 10^2$  à  $7 \cdot 10^3$  fois plus faibles que l'activité luciférase obtenue pour les cellules HeLa transfectées dans les mêmes conditions. L'efficacité de transfection des différents types cellulaires a été évaluée en transfectant un plasmide permettant l'expression de la protéine fluorescente YFP. L'observation des cellules fluorescentes au microscope a permis de déterminer que l'efficacité de transfection des cellules HeLa est de 80%, celle des cellules PAZ6 est d'environ 60% et celle des préadipocytes est inférieure à 10%. Les différences d'efficacité de transfection corréleront donc avec les différences d'activités luciférase obtenues. Ces résultats montrent que l'ADN proviral est exprimé dans les préadipocytes après transfection.

La production de la protéine de capsid p24 a été mesurée dans les surnageants prélevés 24 et 72 h après transfection des cellules avec le plasmide proviral (**Figure 28B**). La production de p24 augmente de 18 à 30 et de 9 à 39 pg/mL entre 24 et 72 h p.t. dans les préadipocytes, de 37 à 476 pg/mL dans les cellules PAZ6 et de 7,6 à 362 ng/mL dans les cellules HeLa (**Figure 28B**). Les niveaux d'expression de p24 sont de  $4 \cdot 10^2$  à  $1 \cdot 10^4$  plus faibles dans les surnageants des préadipocytes transfectés par rapport aux cellules HeLa, mais corréleront avec les mesures d'activité luciférase. Bien que le niveau d'expression de p24 reste



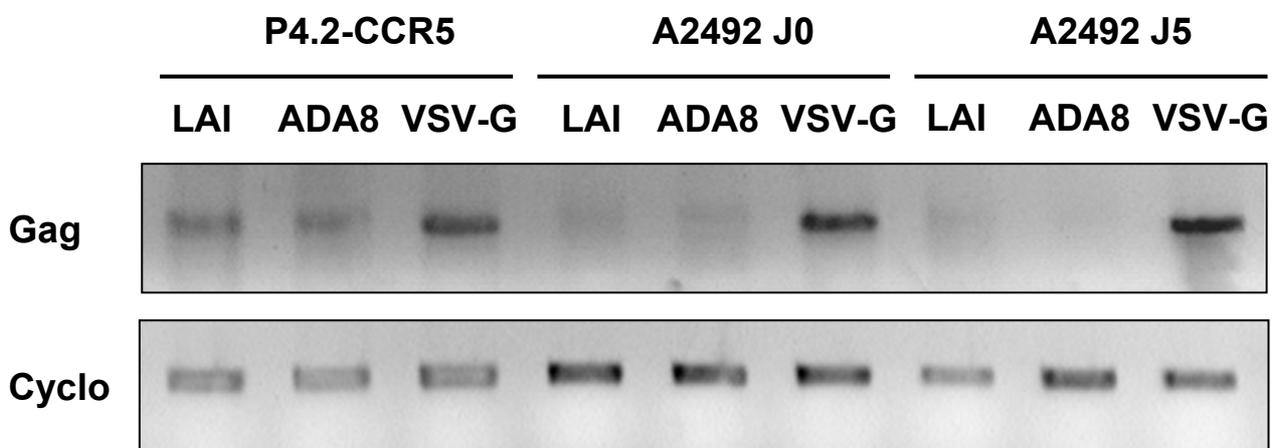
faible, ces résultats démontrent la production de nouvelles particules virales lorsque les préadipocytes sont transfectés avec de l'ADN proviral.

L'ensemble de ces résultats montre que les gènes sous le contrôle du promoteur viral sont correctement exprimés par les préadipocytes et qu'il n'y a pas de blocage au niveau de la transcription du provirus. De plus, la production de particules virales après transfection de l'ADN proviral montre que les étapes post-intégration ne sont pas inhibées dans les préadipocytes.

#### 1.4. Infection de préadipocytes et d'adipocytes par des virus pseudotypés

Afin de déterminer si l'inhibition de la réplication virale est due à un blocage au niveau de l'entrée du virus, différents types cellulaires ont été infectés par des virus pseudotypés avec des glycoprotéines d'enveloppe de tropisme X4 (LAI), de tropisme R5 (ADA8) et de tropisme ubiquitaire (VSV-G). Les mesures d'activités luciférase et de production de p24 ont été réalisées 24, 48 et 72 h post-infection (p.i.) (**Figure 29**).

Aucune activité luciférase n'est détectée dans les cellules HeLa infectées par les virus pseudotypés NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8 (**Figure 29A**). En revanche, lorsque les cellules P4.2 (cellules HeLa exprimant de façon constitutive CD4 et de façon endogène CXCR4) sont transfectées avec un plasmide permettant l'expression de CCR5 (P4.2-CCR5) puis infectées par les virus pseudotypés NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8, l'activité luciférase augmente avec le temps pour atteindre  $9,6 \cdot 10^5$  ILN et  $9 \cdot 10^5$  ILN 72 h p.i., respectivement (**Figure 29B**). Lorsque les préadipocytes (A2492 J0) (**Figure 29C**), les adipocytes différenciés *in vitro* pendant 5 jours (A2492 J5) (**Figure 29D**) et les cellules PAZ6 (**Figure 29E**) sont infectés par les virus pseudotypés NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8, aucune activité luciférase n'est détectée. Au contraire, l'infection des préadipocytes, des adipocytes à J5 de différenciation et des cellules PAZ6 par le virus pseudotypé avec la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G permet



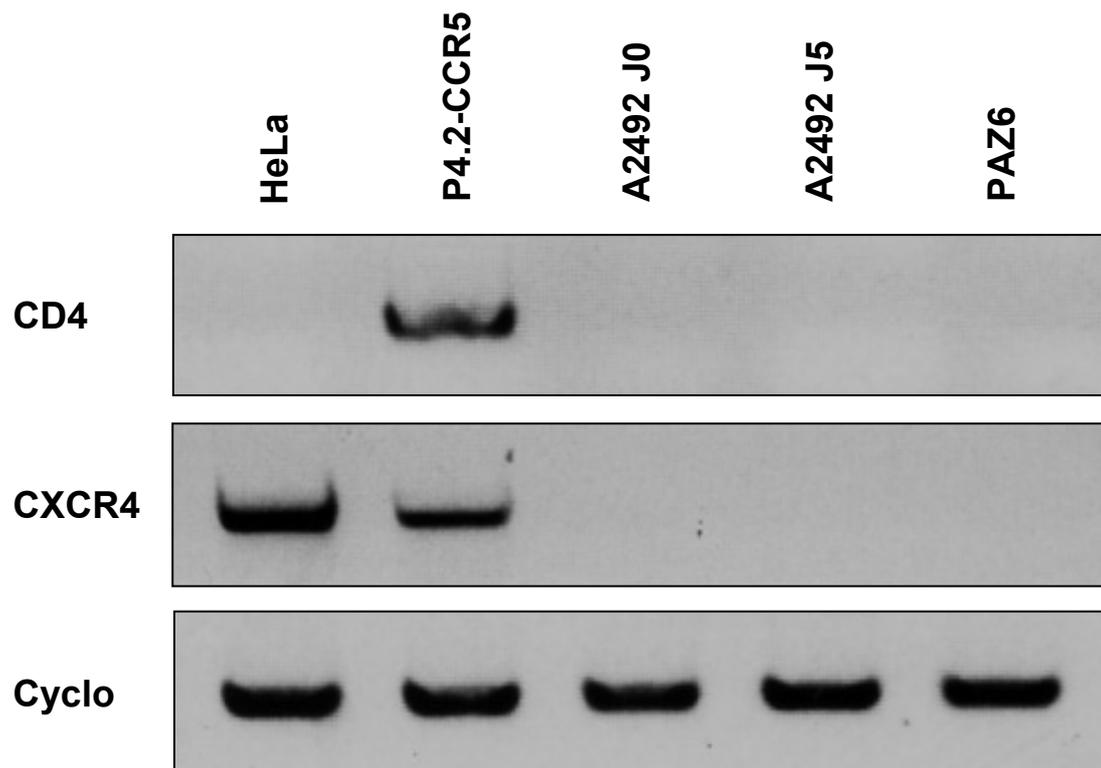
**Figure 30. Détection de l'ADN *gag* dans les cellules infectées par des virus pseudotypés.**

Des cellules P4.2-CCR5, des préadipocytes, et des adipocytes à J5 de différenciation ont été infectées par les virus pseudotypés NL4.3-LAI, NL4.3-ADA8 et NL4.3-VSV-G. Une PCR *gag* (haut) et une PCR *cyclophiline A* (bas) ont été réalisées sur les ADNg extraits 72 h p.i.

d'obtenir une forte activité luciférase ( $1,6 \cdot 10^7$  ILN,  $3,1 \cdot 10^7$  ILN et  $6,2 \cdot 10^7$  ILN 72 h p.i., respectivement) (**Figures 29C, 29D et 29E**). Ces valeurs sont équivalentes ou supérieures à celles obtenues dans les cellules HeLa ou P4.2-CCR5 infectées par le virus pseudotypé NL4.3-VSV-G ( $3,2 \cdot 10^6$  ILN et  $1,1 \cdot 10^7$  ILN 72 h p.i., respectivement) (**Figures 29A et 29B**).

En accord avec les mesures d'activité luciférase, aucune production de p24 n'est détectée dans le surnageant des cellules HeLa, des préadipocytes, des adipocytes et des cellules PAZ6 infectés par les virus pseudotypés NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8 (**Figure 29F**). En revanche, les concentrations de p24 des surnageants des cellules P4.2-CCR5 infectées par les virus NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8 sont respectivement de 234 et 108 pg/mL 72 h p.i. (**Figure 29F**). Pour les préadipocytes, les adipocytes et les cellules PAZ6 infectés par le virus pseudotypé NL4.3-VSV-G, la production de p24 atteint 31, 140 et 126 pg/mL 72 h p.i. (**Figure 29F**). Pour les cellules HeLa et P4.2-CCR5 infectés par le virus NL4.3-VSV-G, les concentrations de p24 sont de 72 et 499 pg/mL 72 h p.i., respectivement (**Figure 29F**).

Nous avons ensuite analysé la présence d'ADN viral dans l'ADN génomique des cellules infectées par les différents virus pseudotypés en amplifiant la région *gag* par PCR. Les ADN<sub>g</sub> des cellules P4.2-CCR5, des préadipocytes et des adipocytes à J5 de différenciation ont été extraits 72 h après infection par les virus pseudotypés NL4.3-LAI, NL4.3-ADA8 et NL4.3-VSV-G. Une amplification par PCR de la séquence *gag* a été effectuée sur les stocks de virus utilisés pour infecter les cellules, afin de vérifier que la détection d'ADN viral provenait bien d'une production virale et non d'une contamination due à la transfection de l'ADN proviral (résultat non montré). Les quantités d'ADN<sub>g</sub> ont été normalisées par amplification de la séquence *cyclophiline A* puis une amplification de la séquence *gag* a été réalisée (**Figure 30**). L'ADN viral est détecté dans l'ADN<sub>g</sub> des cellules P4.2-CCR5 infectées par les virus pseudotypés de différents tropismes (**Figure 30**). En revanche, l'ADN viral est détecté dans l'ADN<sub>g</sub> des préadipocytes et des adipocytes infectés par le virus pseudotypé NL4.3-VSV-G



**Figure 31. Expression des ARNm de *CD4* et *CXCR4*.**

Les ARN des cellules HeLa, P4.2-CCR5, des préadipocytes A2492 J0, des adipocytes à J5 de différenciation et des cellules PAZ6 ont été extraits le jour de l'infection par les virus pseudotypés. Une PCR *CD4* (haut), une PCR *CXCR4* (milieu) et une PCR *cyclophiline A* (bas) ont été réalisées sur les ADNc synthétisés.

mais pas par les virus NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8 (**Figure 30**). Ces résultats confirment qu'il y a eu entrée, transcription inverse, intégration et expression du virus pseudotypé NL4.3-VSV-G.

Une expression virale n'a été observée que pour les préadipocytes, les adipocytes et les cellules PAZ6 infectés par le virus pseudotypé avec la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G. Les virus pseudotypés de tropisme X4 et R5 ne sont pas capables d'infecter ces cellules. Il semble donc que l'entrée des virus pseudotypés LAI et ADA8 dans les cellules du tissu adipeux soit restreinte. Cependant, une fois l'étape d'entrée franchie, aucune étape post-entrée du cycle viral ne semble être bloquée.

### 1.5. Analyse de l'expression des récepteurs CD4, CXCR4 et CCR5

Puisque l'entrée semble être l'étape limitante de la réplication du VIH-1, nous avons analysé l'expression des récepteurs et corécepteurs du VIH-1 dans les cellules du tissu adipeux.

Des expériences de RT-PCR semi-quantitative ont été réalisées sur les ARN totaux extraits des cellules infectées pour déterminer le profil d'expression des ARNm de *CD4* et *CXCR4*. Les quantités d'ADNc ont été normalisées par amplification de la séquence *cyclophiline A* (**Figure 31**). L'ARNm de *CD4* est exprimé dans les cellules P4.2-CCR5 et l'ARNm de *CXCR4* est exprimé dans les cellules HeLa et P4.2-CCR5, comme attendu (**Figure 31**). Cependant, ni le récepteur CD4 ni le corécepteur CXCR4 n'ont été détecté au moment de l'infection des préadipocytes, des adipocytes et des cellules PAZ6 (**Figure 31**). Il semble donc que la restriction de l'entrée virale des virus X4 et R5 soit due à une expression insuffisante des récepteurs. Nous avons donc ré-analysé l'expression des ARNm de *CD4*, *CXCR4* et *CCR5* par RT-PCR semi-quantitative sur 7 biopsies (A2492, A2562, A1832, A1222, M2562, M1211 et M1812), à différents jours de culture et de différenciation. Les

**Tableau 2. Analyse de l'expression de CD4, CXCR4 et CCR5.**

		CD4 (203547_at <sup>b</sup> )			CD4 (216424_at)			CXCR4 (209201_x_at)			CXCR4 (211919_s_at)			CXCR4 (217028_at)			CCR5 (206991_s_at)		
		Signal <sup>c</sup>	D <sup>d</sup>	p-value <sup>e</sup>	Signal	D	p-value	Signal	D	p-value	Signal	D	p-value	Signal	D	p-value	Signal	D	p-value
A2562 <sup>a</sup>	J0	25,8	A	0,303	1,5	A	0,904	313,0	P	0,000244	344,7	P	0,000244	286,8	P	0,000244	6,0	A	0,932
	J2	27,3	A	0,366	1,2	A	0,962	292,0	P	0,00193	280,1	P	0,00122	349,8	P	0,000732	5,0	A	0,932
	J5	13,4	A	0,466	0,9	A	0,985	598,5	P	0,000244	613,0	P	0,000244	526,9	P	0,000244	5,2	A	0,870
	J15+M	25,4	A	0,334	0,8	A	0,820	813,3	P	0,00244	778,2	P	0,000244	717,4	P	0,000244	19,6	A	0,601
M2562	J0	11,0	A	0,466	0,7	A	0,943	4,3	A	0,904	20,9	A	0,366	5,6	A	0,432	14,7	A	0,665
	J2	27,9	A	0,601	0,8	A	0,932	5,4	A	0,850	29,6	A	0,304	0,4	A	0,754	6,1	A	0,780
	J2+M	30,7	A	0,432	1,0	A	0,888	287,1	P	0,00195	345,8	P	0,001221	371,3	P	0,000244	4,2	A	0,754
	J5	32,2	A	0,398	0,8	A	0,953	6,3	A	0,904	38,5	A	0,366	0,3	A	0,919	6,7	A	0,829
	J5+M	18,7	A	0,533	0,5	A	0,943	595,1	P	0,000244	604,6	P	0,000244	605,7	P	0,000244	29,4	A	0,534
	J15	31,0	A	0,274	1,3	A	0,870	4,4	A	0,828	29,3	A	0,366	1,2	A	0,888	5,6	A	0,850
J15+M	16,4	A	0,334	0,8	A	0,919	1455,5	P	0,000244	1213,6	P	0,000244	1184,4	P	0,000244	5,5	A	0,829	
M1211	J0	20,4	A	0,466	1,4	A	0,904	7,0	A	0,725	47,6	A	0,149	13,0	M	0,056	3,1	A	0,995
	J5+M	32,2	A	0,366	2,0	A	0,828	10,3	A	0,850	52,2	A	0,274	1,1	A	0,533	13,3	A	0,828
	J5+M	20,4	A	0,500	1,5	A	0,888	8,6	A	0,888	50,9	A	0,303	3,4	A	0,500	14,3	A	0,696
A1832	J5+M	16,4	A	0,422	0,7	A	0,962	2,8	A	0,943	21,6	A	0,503	4,4	A	0,149	4,7	A	0,805
	J5+M	21,3	A	0,665	1,3	A	0,943	11,1	A	0,780	42,6	A	0,274	5,3	A	0,219	11,2	A	0,665

<sup>a</sup> Prédipocytes de 4 donneurs différents (A2562, M2562, M1211 et A1832) cultivés pendant 0, 2, 5 ou 15 jours (J0, J2, J5, J15) ou différenciés pendant 2, 5 ou 15 jours (J2+M, J5+M, J15+M).

<sup>b</sup> Référence Affymetrix U133-A.

<sup>c</sup> Intensité du signal d'hybridation.

<sup>d</sup> Détection : Absent (A), Présent (P), Modéré (M).

<sup>e</sup> Valeur p du signal de détection, p-value < 0,048 pour une hybridation spécifique.

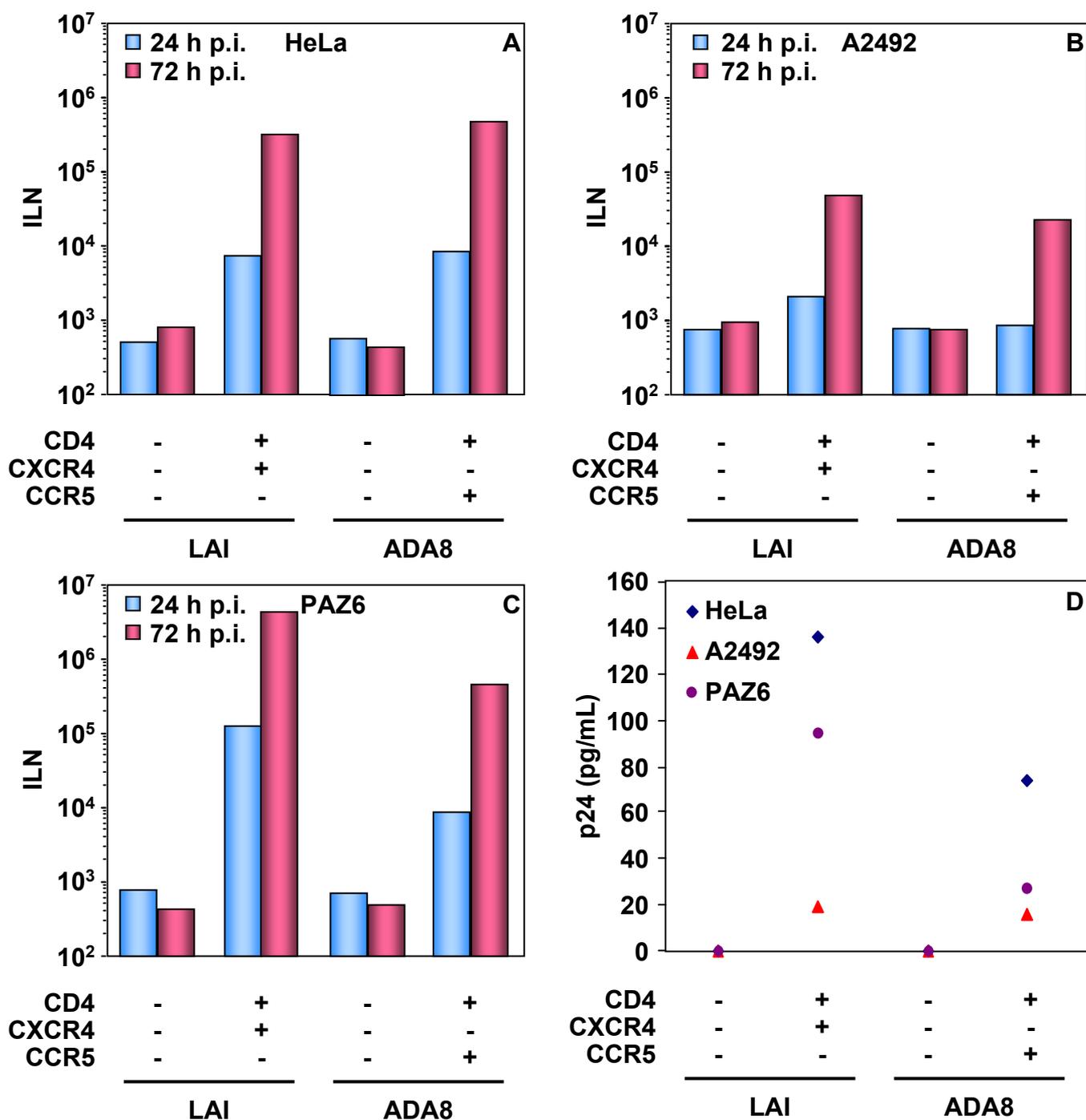
ARNm de *CD4* et de *CCR5* n'ont jamais été détectés (résultats non montrés). L'ARNm de *CXCR4* a été détecté mais son expression varie en fonction des conditions de culture, de l'origine du tissu adipeux (abdominal ou mammaire) ainsi que du stade de différenciation.

Ces résultats ont été confirmés en utilisant une technique d'hybridation sur micropuces Affymetrix. Nous avons réalisé l'hybridation des ARN extraits de préadipocytes et d'adipocytes différenciés *in vitro* provenant de 4 biopsies de donneurs différents (**Tableau 2**). Les ARNm de *CD4* et de *CCR5* n'ont jamais été détectés, quelque soit le nombre de jours en culture ou de différenciation des cellules des 4 biopsies (**Tableau 2**). L'ARNm de *CXCR4* a été détecté dans 2 biopsies (A2562 et M262) sur 4. L'ARNm *CXCR4* est exprimé à tous les points pour la biopsie A2562 et l'intensité du signal augmente au cours du temps de culture et de différenciation (**Tableau 2**). Pour la biopsie M2562, l'ARNm *CXCR4* est exprimé seulement dans les cellules différenciées et l'intensité du signal augmente au cours de la différenciation (**Tableau 2**). L'expression de l'ARNm de *CXCR4* varie en fonction de la biopsie et du nombre de jours en culture ou de différenciation. La co-expression de *CD4*, *CXCR4* et *CCR5* n'a jamais été observée en même temps sur les cellules provenant d'une même biopsie.

La co-expression des récepteurs d'entrée du VIH-1 est un évènement rare, ce qui pourrait expliquer la faible efficacité d'infection des cellules du tissu adipeux *in vitro*. Le VIH-1 peut entrer et se répliquer dans ces cellules si une glycoprotéine de tropisme ubiquitaire est fournie en *trans* pour compléter la particule virale.

### **1.6. Infection de préadipocytes transfectés avec les récepteurs du VIH-1 par des virus pseudotypés**

Pour vérifier que le blocage d'entrée est dû à un manque d'expression des récepteurs, nous avons transfecté des préadipocytes primaires et des cellules PAZ6 avec des plasmides



**Figure 32. Infection de préadipocytes transfectés avec les récepteurs du VIH-1 par des virus pseudotypés.**

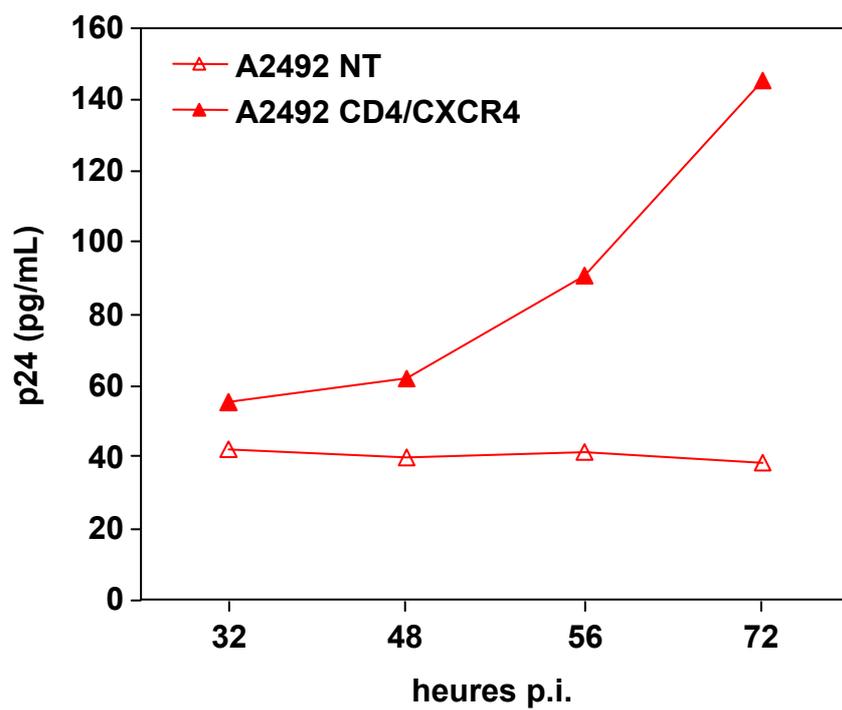
Des cellules HeLa (A), des préadipocytes A2492 (B) et des cellules PAZ6 (E) ont été transfectées (+) ou non (-) avec les plasmides CD4, CXCR4 et CCR5 comme indiqué. Après 24 h de transfection, les cellules ont été infectées avec 20 ng de virus pseudotypés NL4.3-LAI ou NL4.3-ADA8. Les mesures d'activités luciférase ont été réalisées à 24 et 72 h post-infection (p.i.). ILN : Index Luciférase Normalisé. Le seuil de détection est de  $10^3$  ILN. Le dosage de la protéine p24 a été réalisé 72 h p.i. (D). Ces résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

exprimant CD4/CXCR4 et CD4/CCR5 puis nous les avons infectés 24 h p.t. par des virus pseudotypés de tropisme X4 et R5, respectivement. Les mesures d'activités luciférase et de production de p24 ont été réalisées 24 et 72 h p.i. (**Figure 32**).

Aucune activité luciférase n'est détectée dans les cellules infectées par les virus pseudotypés mais non transfectées avec les récepteurs d'entrée (**Figure 32**). Une forte activité luciférase est détectée dans les cellules HeLa (**Figure 32A**), les préadipocytes (**Figure 32B**) et les cellules PAZ6 (**Figure 32C**) transfectés au préalable avec les récepteurs du VIH-1 et infectées par les virus pseudotypés NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8. L'activité luciférase augmente avec le temps pour atteindre 72 h p.i.  $3,4 \cdot 10^5$  et  $5 \cdot 10^5$  ILN dans les cellules HeLa (**Figure 32A**),  $5,2 \cdot 10^4$  et  $2,4 \cdot 10^4$  ILN dans les préadipocytes (**Figure 32B**) et  $4,7 \cdot 10^6$  et  $4,9 \cdot 10^5$  ILN dans les cellules PAZ6 (**Figure 32C**) transfectées avec les plasmides CD4 et CXCR4 ou CD4 et CCR5 puis infectées par les virus NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8, respectivement.

En accord avec ces résultats, la production de p24 peut être détectée 72 h p.i. par les virus NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8 uniquement dans les surnageants des préadipocytes (19 et 16 pg/mL) et des cellules PAZ6 (94 et 27 pg/mL) transfectés avec les récepteurs du VIH-1 (**Figure 32D**). La production de p24 dans les surnageants des cellules HeLa transfectées avec CD4 et CXCR4 ou CCR5 et infectées avec les virus NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8 est de 136 et 74 pg/mL, respectivement (**Figure 32D**).

Ces résultats montrent que l'infection des préadipocytes par les virus pseudotypés de tropisme X4 et R5 peut être restaurée après transfection des récepteurs et corécepteurs d'entrée du VIH-1, confirmant que l'entrée est l'étape limitante de l'infection des cellules du tissu adipeux.



**Figure 33. Infection des préadipocytes par le virus NDK.**

Des préadipocytes A2492 ont été transfectés ou non (NT) avec les plasmides CD4 et CXCR4 puis infectés 24 h p.t. par 20 ng de virus NDK. Le dosage de la protéine p24 a été réalisé sur les surnageants prélevés 32, 48, 56 et 72 h p.i.

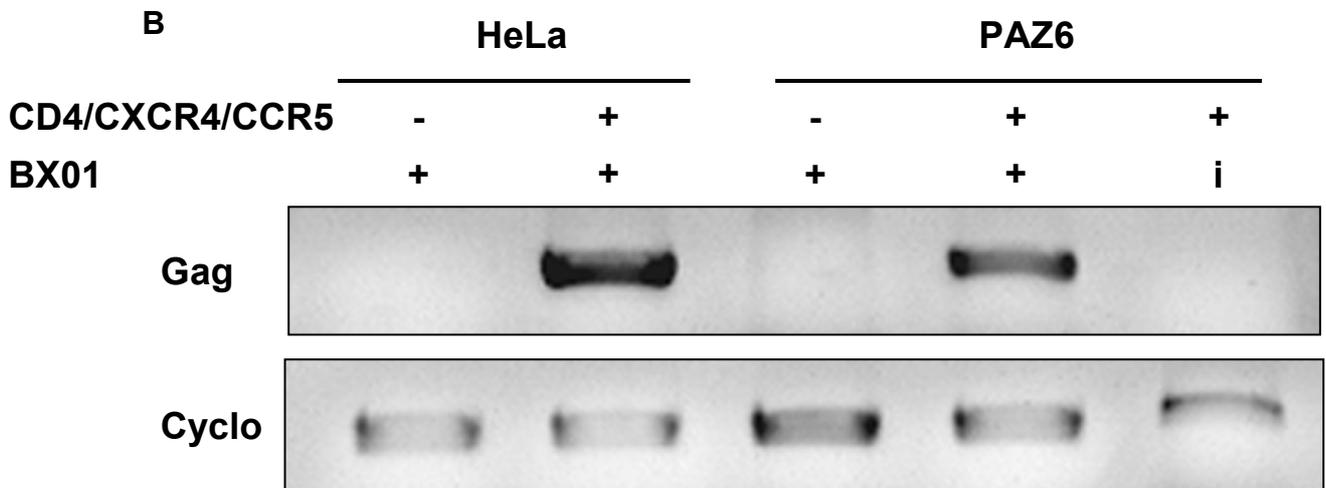
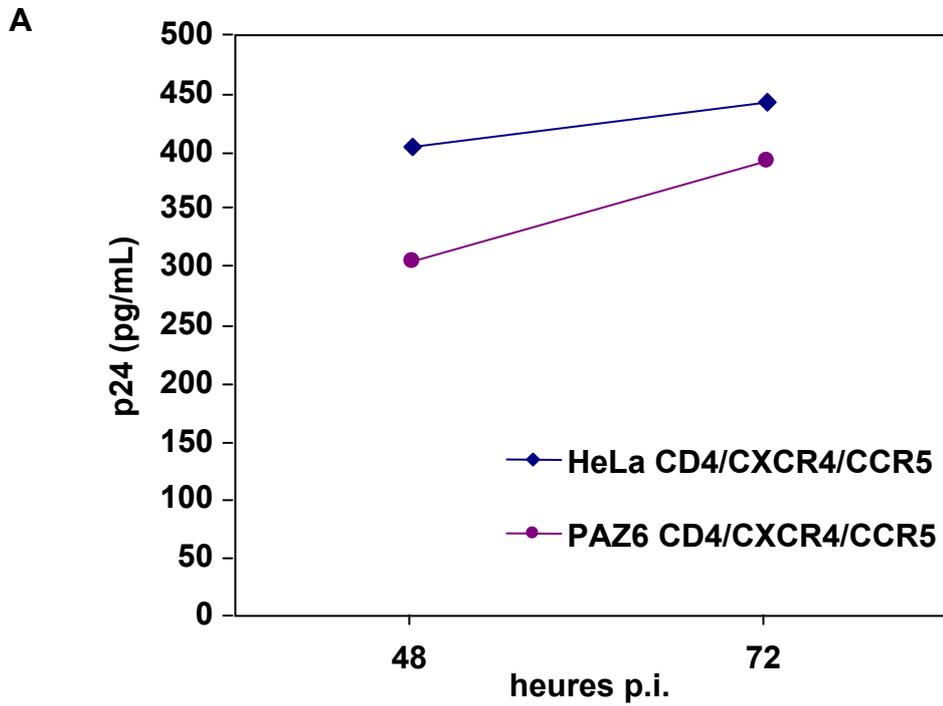
### 1.7. Infection de préadipocytes transfectés avec les récepteurs du VIH-1 par des virus adaptés et primaires

Afin de confirmer ces résultats, nous avons infecté d'une part, des préadipocytes primaires par le virus adapté de laboratoire de tropisme X4 NDK, et d'autre part, des cellules PAZ6 par les virus primaires BRU-F, AMI et BX01 provenant de patients VIH-1 positifs.

Les préadipocytes A2492 ont été transfectés ou non avec les plasmides d'expression pour CD4 et CXCR4 puis infectés 24 h p.t. par 20 ng de virus de tropisme X4 NDK. La production de la protéine p24 a été mesurée 32, 48, 56 et 72 h p.i. (**Figure 33**). La protéine p24, détectée dans le surnageant des préadipocytes non transfectés (environ 40 pg/mL), n'augmente pas au cours du temps p.i. et correspond probablement à de la p24 résiduelle. Dans les surnageants des préadipocytes transfectés avec les plasmides CD4 et CXCR4, la concentration de p24 augmente au cours du temps après infection par le virus NDK pour atteindre 145 pg/mL 72 h p.i. (**Figure 33**). Ces résultats montrent qu'il y a eu entrée du virus NDK et production virale dans les préadipocytes uniquement après transfection des récepteurs du VIH-1.

Des cellules HeLa et PAZ6 ont été transfectées avec les plasmides d'expression pour CD4, CXCR4 et CCR5 puis infectées 24 h p.t. par les virus primaires BRU-F, AMI et BX01. Les surnageants ont été prélevés 48 et 72 h p.i. pour un dosage de p24 et les ARN ont été extraits 72 h p.i. pour effectuer une amplification de la séquence *gag* par RT-PCR (**Figure 34**).

Après 72 h d'infection, les taux de p24 des surnageants des cellules HeLa et des cellules PAZ6 transfectées avec les plasmides CD4, CXCR4 et CCR5 puis infectées par les virus primaires BRU-F et AMI se sont révélés non significatifs. Pour l'infection avec le virus BX01, les taux de p24 ont augmenté avec le temps pour atteindre respectivement 443 et 393 pg/mL 72 h p.i. dans les cellules HeLa et PAZ6 transfectées (**Figure 34A**). Un test p24 a été réalisé sur les cellules HeLa et PAZ6 non transfectées et infectées par le virus BX01 et sur les



**Figure 34. Infection des cellules HeLa et PAZ6 par le virus primaire BX01.**

(A) Le dosage de la protéine p24 des surnageants des cellules HeLa et PAZ6 transfectées avec les plasmides CD4/CXCR4/CCR5 puis infectées avec le virus primaire BX01 a été réalisé 48 et 72 h p.i. (B) Les cellules HeLa et les cellules PAZ6 ont été transfectées (+) ou non (-) avec les plasmides CD4, CXCR4 et CCR5 puis infectées 24 h p.t. par le virus BX01 (+) ou le virus BX01 inactivé pendant 1 h à 56°C (i). Une RT-PCR *gag* (haut) et une RT-PCR *cyclophiline A* (bas) ont été réalisées sur les ARN extraits 72 h p.i.

cellules HeLa et PAZ6 transfectées avec les plasmides CD4, CXCR4 et CCR5 puis infectées par le virus BX01 inactivé pendant 1 h à 56°C. Les taux de p24 obtenus se sont révélés négatifs confirmant ainsi la validité de la détection précédente (résultat non montré).

L'expression des ARNm viraux a été analysée par RT-PCR *gag* dans les cellules HeLa et PAZ6 transfectées ou non avec les plasmides CD4, CXCR4 et CCR5 et infectées par le virus primaire BX01 (**Figure 34B**). Les virus BRU-F et AMI étant peu infectieux, nous n'avons pas réalisé de RT-PCR *gag* sur les ARN extraits des cellules infectées par ces deux virus. Les quantités d'ADNc ont été normalisées par amplification de la séquence *cyclophiline A* (**Figure 34B**). Les ARNm *gag* ont été exprimés par les cellules HeLa et PAZ6 infectées par le virus primaire BX01 après transfection des plasmides CD4, CXCR4 et CCR5 (**Figure 34B**). L'ARNm *gag* n'a pas été détecté dans les ARN extraits des cellules HeLa et PAZ6 infectées mais non transfectées (**Figure 34B**) ni dans les cellules PAZ6 transfectées et infectées par le virus BX01 inactivé (**Figure 34B**). L'amplification de la séquence *gag* par RT-PCR confirme les résultats de production de p24. Ces résultats montrent qu'il y a eu entrée, expression des ARNm viraux et production virale dans les cellules PAZ6 transfectées par les plasmides CD4, CXCR4 et CCR5 puis infectées par le virus primaire BX01.

L'expression des récepteurs par transfection permet donc la réalisation d'un cycle viral complet d'une souche de laboratoire et d'un isolat primaire. Ces résultats confirment ceux obtenus avec les virus pseudotypés et soutiennent l'hypothèse d'une restriction au niveau de l'entrée du VIH-1 dans les cellules du tissu adipeux.

## 1.8. Conclusion

Nous n'avons pas observé de blocage au niveau des étapes post-intégration après transfection d'un ADN proviral dans des préadipocytes primaires. L'infection de ces cellules par des virus pseudotypés a montré que la réplication des virus de tropismes X4 et R5 est

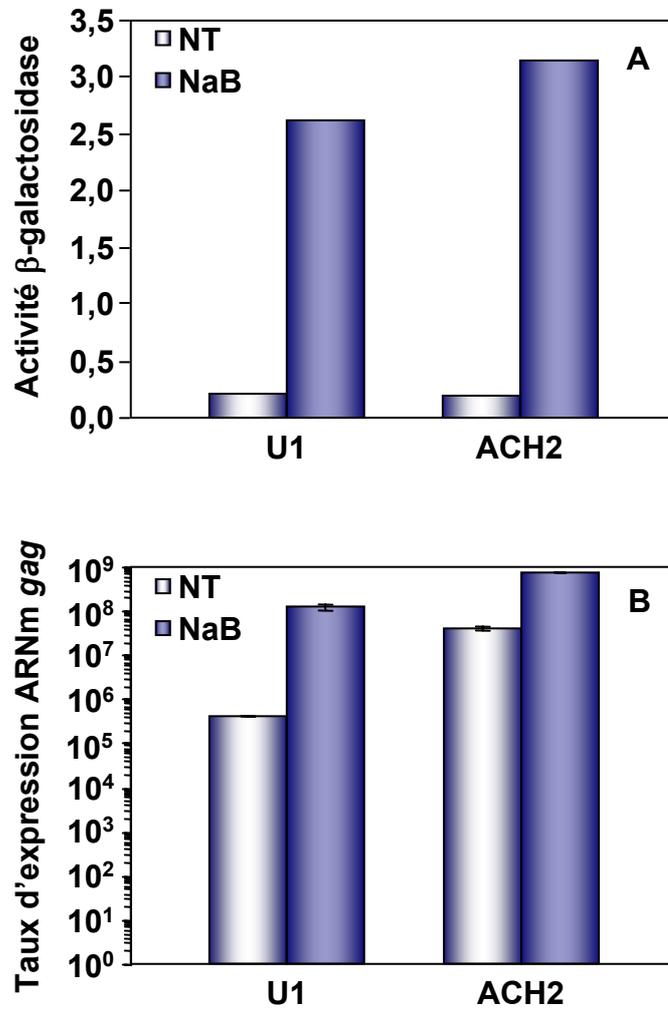
restreinte contrairement à celle du virus portant une enveloppe de tropisme ubiquitaire. En revanche, si les récepteurs sont apportés en *trans*, l'infection des préadipocytes par les virus de tropismes X4 et R5 est restaurée. L'entrée virale semble donc être l'étape limitante de l'infection des cellules du tissu adipeux par le VIH-1, et ce en raison d'une co-expression insuffisante des récepteurs viraux. Ces résultats suggèrent que le tissu adipeux n'est pas une cible privilégiée pour le virus *in vivo* (Munier et al., 2003).

## **2. RECHERCHE DE GENES CELLULAIRES CANDIDATS IMPLIQUES DANS LE CONTROLE DE LA LATENCE DU VIH-1**

### **2.1.Introduction**

#### **2.1.1. Incidence de l'infection du VIH-1 sur la transcription cellulaire**

L'utilisation des micropuces à haute densité pour l'analyse de l'expression transcriptionnelle s'est révélée être un outil intéressant pour l'étude des interactions hôte-virus (pour revue (Kato-Maeda et al., 2001)). En effet, des stratégies utilisant des micropuces ont montré des changements au niveau de la transcription des gènes cellulaires en réponse à l'expression de protéines du VIH-1 (Nef (Shaheduzzaman et al., 2002; Simmons et al., 2001), Tat (De la Fuente et al., 2002; Izmailova et al., 2003), gp120 (Cicala et al., 2002), ou Vpr (Janket et al., 2004)) ou suivant une infection aiguë de lignées cellulaires (Geiss et al., 2000; Van 't Wout et al., 2003; Wen et al., 2005) ou de PBMC (Vahey et al., 2002). Les micropuces ont également été utilisées pour caractériser l'expression des gènes dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents de patients infectés virémiques et avirémiques (Chun et al., 2003). Récemment, les changements de l'expression des gènes dans des lignées cellulaires infectées de façon latente par le VIH-1 et dont la réplication virale est induite par le PMA ont été décrits par Krishnan et collaborateurs (Krishnan and Zeichner, 2004).



**Figure 35. Analyse de la réactivation virale après stimulation des cellules U1 et ACH2 par le NaB.**

Les cellules U1 et ACH2 ont été stimulées par 10 mM de NaB pendant 24 h. Les cellules ont été mises en co-culture avec des cellules indicatrices P4.2 et l'activité  $\beta$ -galactosidase a été mesurée (A). L'expression des ARNm *gag* a été mesurée par RT-PCRq à partir des ARN extraits (B).

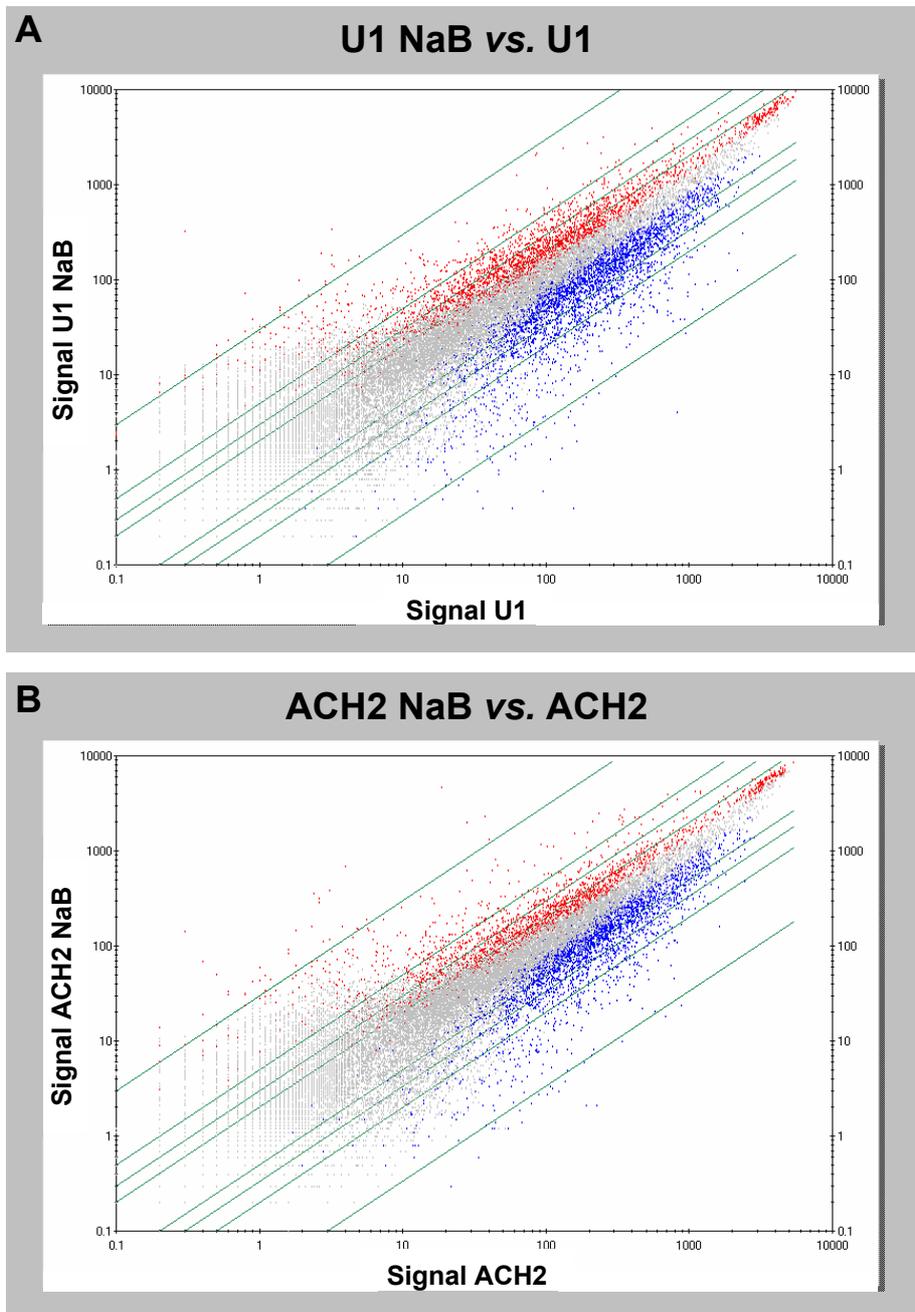
### 2.1.2. Objectifs

L'existence de réservoirs de latence virale est un obstacle majeur à l'éradication de l'infection par le VIH-1. Les mécanismes moléculaires permettant le maintien et la réactivation de la latence du virus VIH-1 dans ses réservoirs cellulaires ne sont pas élucidés, mais il semble que la latence post-intégrative dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents soit le reflet d'une régulation de l'expression virale au niveau transcriptionnel. Afin d'élaborer de nouvelles stratégies antivirales, il est donc essentiel de mieux comprendre les mécanismes transcriptionnels impliqués dans le contrôle de la latence virale. Nous avons ainsi entrepris d'analyser le transcriptome différentiel de lignées cellulaires infectées de façon latente par le VIH-1 et stimulées ou non pour la réactivation de la latence virale.

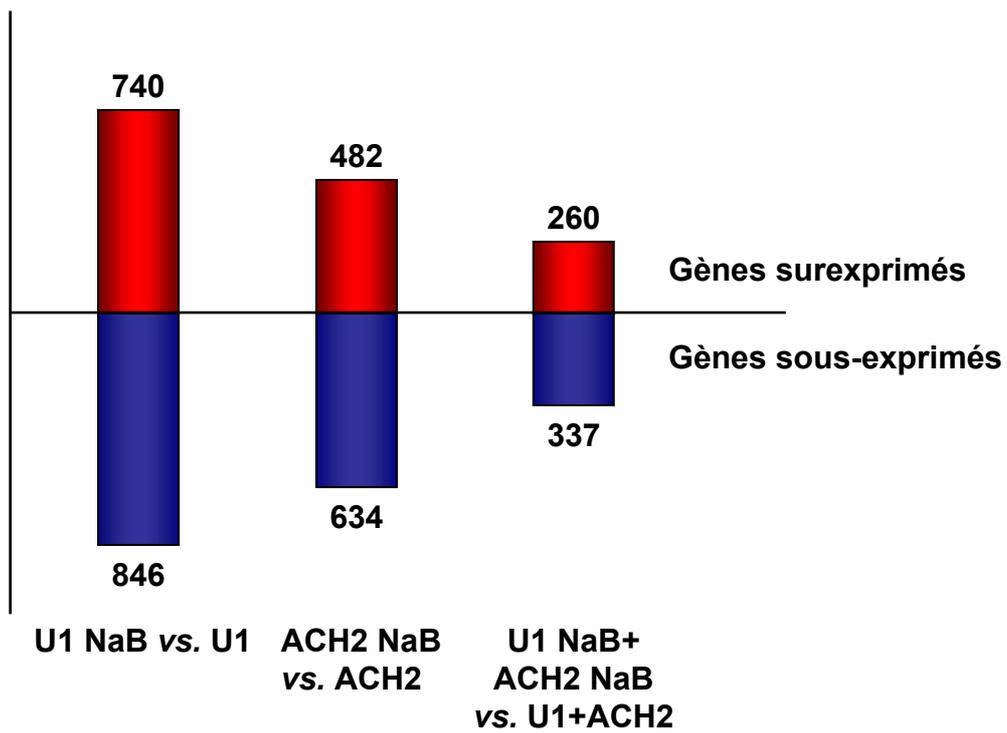
## 2.2. Analyse du transcriptome différentiel de lignées cellulaires infectées par le VIH-1 par micropuces à haute densité

Nous avons choisi deux modèles de lignées cellulaires : la lignée humaine de promonocytes U1 et la lignée humaine de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ACH2 infectées de façon latente (Pomerantz et al., 1990). La lignée U1 provient d'un clone de cellules U937 infectées chroniquement par le VIH-1 et contient deux copies de provirus intégré (Folks et al., 1987; Folks et al., 1988). La lignée ACH2 provient d'un clone de cellules A3.01 (cellules dérivant de CEM) ayant survécu à une infection aiguë par le VIH-1 et contient une seule copie de provirus intégré (Clouse et al., 1989; Folks et al., 1989).

Les cellules U1 et ACH2 ont été stimulées ou non pour la réactivation de la latence par un inhibiteur d'histone déacétylase : le butyrate de sodium (NaB) (Quivy et al., 2002). Les cellules infectées de façon latente ont été traitées ou non pendant 24 h avec 10 mM de NaB. Les lignées parentales non infectées, U937 et CEM, ont été soumises au même traitement. La réactivation virale a été vérifiée par co-culture avec des cellules indicatrices et par mesure de

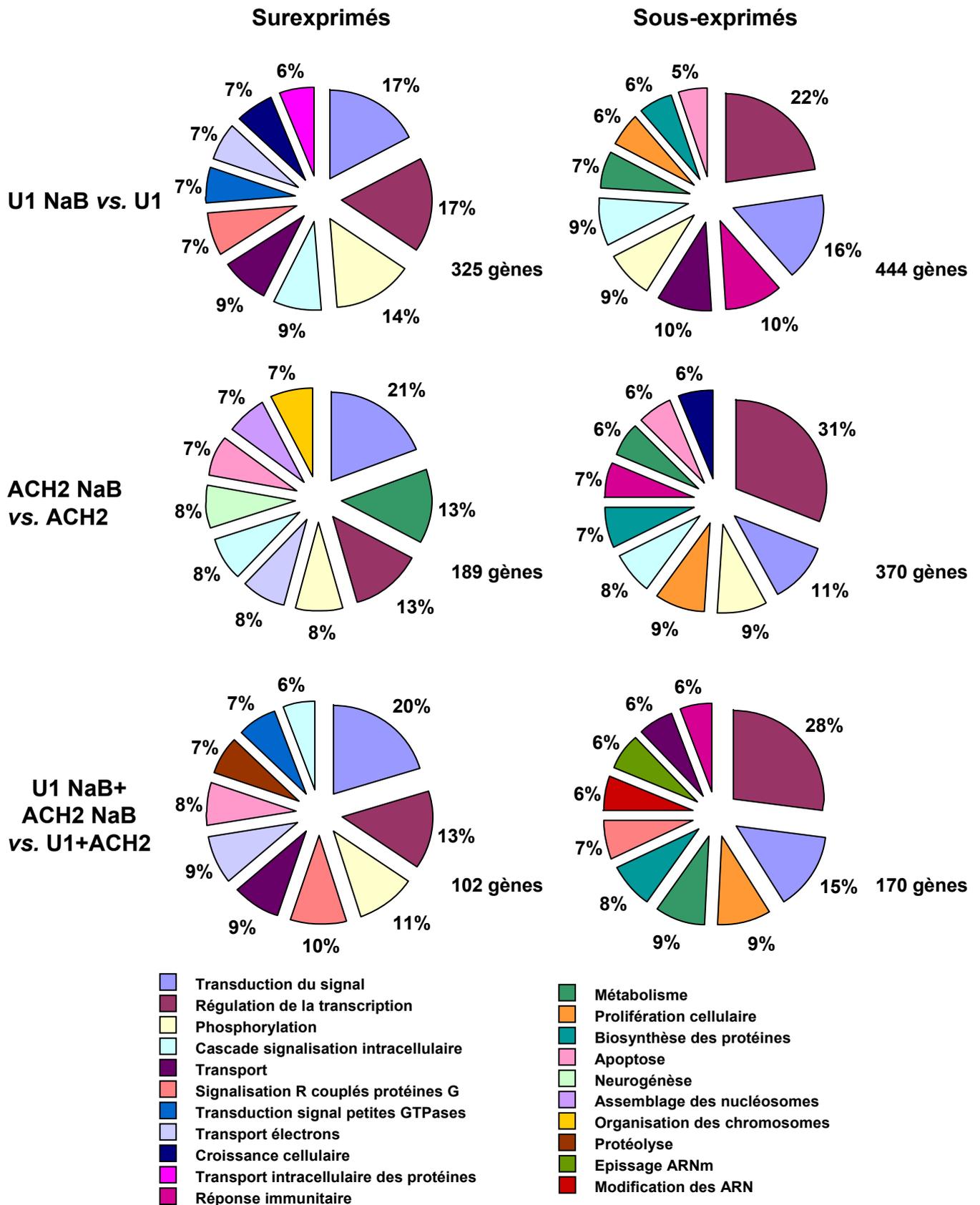


**Figure 36. Comparaison des intensités d'hybridation après stimulation des cellules U1 et ACH2 par le NaB.** Les intensités d'hybridation (Signal) des cellules infectées de façon latente U1 (A) et ACH2 (B) et stimulées par le NaB sont représentées en fonction des intensités d'hybridation des cellules non traitées. Les gènes surexprimés sont représentés en rouge, les gènes sous-exprimés en bleu et les gènes dont l'expression est inchangée en gris.



**Figure 37. Nombre de gènes exprimés de façon différentielle après stimulation des cellules U1 et ACH2 par le NaB.**

Le nombre de gènes surexprimés (en rouge) ou sous-exprimés (en bleu) dans les cellules infectées de façon latente et stimulées par le NaB par rapport aux cellules non traitées sont indiqués. + : gènes régulés en commun.



**Figure 38. Fonctions régulées de façon différentielle après stimulation des cellules U1 et ACH2 par le NaB.** Les dix fonctions les plus représentées régulées dans les cellules infectées de façon latente stimulées par le NaB par rapport aux cellules non traitées sont indiquées. + : fonctions régulées en commun. Le nombre de gènes appartenant aux fonctions régulées est indiqué.

l'expression des ARNm *gag* (**Figure 35**). L'activité  $\beta$ -galactosidase des cellules indicatrices mises en co-culture avec les cellules infectées de façon latente augmente lorsque les cellules ont été traitées par le NaB (**Figure 35A**). De même, l'expression des ARNm *gag* mesurée par RT-PCRq à partir des ARN extraits des cellules infectées augmente après traitement par le NaB (**Figure 35B**).

Les ARN des cellules U1 et ACH2 traitées ou non par le NaB ont été extraits après 24 h et leurs quantités et qualités ont été évaluées par dosage spectrophotométrique et dépôt sur gel d'agarose. Les ARN ont ensuite été envoyés à la plate-forme Affymetrix de l'IGBMC à Strasbourg pour marquage et hybridation sur les micropuces à haute densité U133A Affymetrix. Les micropuces Affymetrix U1333A sont composées de 22283 spots d'oligonucléotides spécifiques de gènes et de séquences répertoriés dans les banques de données et permettent d'analyser les variations d'expression de milliers de transcrits.

Le profil d'expression des ARNm des cellules infectées de façon latente a été comparé à celui des cellules non traitées : U1 NaB vs. U1 et ACH2 NaB vs. ACH2 (**Figure 36**). Nous avons utilisé comme critères de sélection des gènes exprimés de façon différentielle un rapport des intensités d'hybridation en  $\log_2 \geq 1$  pour les gènes surexprimés avec une valeur  $p < 0,0001$  et un rapport des intensités d'hybridation en  $\log_2 \leq -1$  pour les gènes sous-exprimés avec une valeur  $1-p > 0,9999$ . Nous avons identifié 740 gènes surexprimés et 896 gènes sous-exprimés dans les cellules U1 traitées par le NaB, 482 gènes surexprimés et 634 gènes sous-exprimés dans les cellules ACH2 traitées par le NaB, et 260 gènes surexprimés et 337 gènes sous-exprimés à la fois dans les cellules U1 et ACH2 traitées par le NaB par rapport aux cellules non traitées (**Figure 37**).

Les gènes régulés par le traitement au NaB sont impliqués principalement dans la régulation de la transcription, la transduction du signal, la réponse immunitaire, le transport des protéines, le métabolisme, l'apoptose et la modification des ARN (**Figure 38**). Quelques

**Tableau 3. Gènes surexprimés dans les cellules U1 et ACH2 stimulées par le NaB par rapport aux cellules non traitées.**

Symbol	Nom	U1 NaB vs. ACH2 NaB	
		U1 <sup>a</sup>	vs. ACH2 <sup>a</sup>
<b>Transcription</b>			
HIS1	HMBA-inducible	2,7	1,1
EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	2,4	3,1
MYBL1	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1	2,4	1,7
ZNF277	zinc finger protein (C2H2 type) 277	2,2	1,9
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	2,1	1
RYBP	RING1 and YY1 binding protein	2	1,5
NFIL3	nuclear factor, interleukin 3 regulated	2	1,1
YPEL5	yippee-like 5 (Drosophila)	1,9	2,3
CTNNBIP1	catenin, beta interacting protein 1	1,6	2,1
SIRT2	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 2	1,6	1,5
TCEA2	transcription elongation factor A (SII), 2	1,6	1,5
HDAC3	histone deacetylase 3	1,6	1,3
<b>Transduction du signal</b>			
RALGPS1	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 1	3,9	2,1
RRAS	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	3,3	5
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	2,8	1,2
TNFSF9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	2,5	1,9
GRN	granulin	2,4	2,1
RAB40B	RAB40B, member RAS oncogene family	2,2	1,2
RTN2	reticulon 2	1,8	2,3
GPSM2	G-protein signalling modulator 2 (AGS3-like, C. elegans)	1,8	1,7
ARL3	ADP-ribosylation factor-like 3	1,8	1,6
RABL4	RAB, member of RAS oncogene family-like 4	1,8	1,3
RPS6KC1	ribosomal protein S6 kinase, 52kDa, polypeptide 1	1,8	1,1
PPP2R5B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), beta isoform	1,7	1,8
<b>Réponse immunitaire</b>			
SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	4,1	2,9
IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	4	2
<b>Transport des protéines</b>			
NPC1	Niemann-Pick disease, type C1	2,3	3,9
SNAP29	synaptosomal-associated protein, 29kDa	1,8	1,3
GABARAPL	GABA(A) receptor-associated protein-like 2	1,7	1,2
SNAP23	synaptosomal-associated protein, 23kDa	1,7	1,2
GDI1	GDP dissociation inhibitor 1	1,6	1,3
STX12	syntaxin 12	1,4	1,3
RNP24	coated vesicle membrane protein	1,4	1
<b>Divers</b>			
ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	8,7	2,1
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	6,3	3,9
SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1	5,5	5,4
TXNIP	thioredoxin interacting protein	4,5	3,3
SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	4	2,3
SGK	serum/glucocorticoid regulated kinase	3,9	4,6
HHLA3	HERV-H LTR-associating 3	3,5	1,4
SYT11	synaptotagmin XI	3,4	2,5
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	3,3	4,9

<sup>a</sup> Rapport des intensités d'hybridation en log<sub>2</sub>.

**Tableau 4. Gènes surexprimés dans les cellules U1 stimulées par le NaB par rapport aux cellules non traitées.**

Symbol	Nom	U1 NaB vs. U1 <sup>a</sup>
<b>Transcription</b>		
KLF2	Kruppel-like factor 2 (lung)	3,7
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	3,2
NR4A2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	3,2
NCOA3	nuclear receptor coactivator 3	2,5
NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	2,4
SSBP2	single-stranded DNA binding protein 2	2,4
MLLT3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia ; translocated to, 3	2,3
SIRT4	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 4 (S. cerevisiae)	2,2
USP49	ubiquitin specific protease 49	2,2
BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	2,1
SMARCD3	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin	2,1
ZNF297B	zinc finger protein 297B	2,1
<b>Transduction du signal</b>		
RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	3,9
ANXA1	annexin A1	3,1
LY96	lymphocyte antigen 96	2,9
CHP	calcium binding protein P22	2,7
CD69	CD69 antigen (p60, early T-cell activation antigen)	2,5
TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	2,5
GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5	2,3
RGL1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1	2,3
OPTN	optineurin	2,1
RAB8B	RAB8B, member RAS oncogene family	2
GNB5	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5	1,7
TRIM23	tripartite motif-containing 23	1,7
RAB3D	RAB3D, member RAS oncogene family	1,6
<b>Réponse immunitaire</b>		
C3	complement component 3	5,4
G1P3	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-6-16)	3,1
FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1	3
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	2,4
<b>Transport des protéines</b>		
COPA	coatamer protein complex, subunit alpha	2,3
ACBD3	acyl-Coenzyme A binding domain containing 3	1,7
PEX13	peroxisome biogenesis factor 13	1,7
AP3D1	adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit	1,6
AP1S2	adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit	1,5
PEX1	peroxisome biogenesis factor 1	1,5
SNX1	Sorting nexin 1	1,5
VPS45A	vacuolar protein sorting 45A (yeast)	1,4
APPBP2	amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2	1,3
<b>Divers</b>		
SERPINE1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin)	5,6
C5R1	complement component 5 receptor 1 (C5a ligand)	5,3
FABP6	fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotropin)	5,1
IL21R	interleukin 21 receptor	4,9

<sup>a</sup> Rapport des intensités d'hybridation en log<sub>2</sub>.

**Tableau 5. Gènes surexprimés dans les cellules ACH2 stimulées par le NaB par rapport aux cellules non traitées.**

Symbol	Nom	ACH2 NaB vs. ACH2 <sup>a</sup>
<b>Transcription</b>		
SIRT5	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 5 ( <i>S. cerevisiae</i> )	3,5
IRF7	interferon regulatory factor 7	2,5
HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	1,9
FOXO1A	forkhead box O1A (rhabdomyosarcoma)	1,6
SMAD7	SMAD, mothers against DPP homolog 7 ( <i>Drosophila</i> )	1,4
DLX4	distal-less homeobox 4	1,3
NFRKB	nuclear factor related to kappa B binding protein	1,3
PPP1R10	protein phosphatase 1, regulatory subunit 10	1,3
ZFP95	zinc finger protein 95 homolog (mouse)	1,3
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1,2
<b>Transduction du signal</b>		
PARG1	PTPL1-associated RhoGAP 1	3,3
NRGN	neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	3
CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	2,5
RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family	2,1
CAPN5	calpain 5	1,6
OPTN	optineurin	1,6
EPOR	erythropoietin receptor	1,4
PTPN1	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	1,4
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1,3
RALB	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B	1,3
CBLB	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b	1,2
GNA11	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	1,2
RHOF	ras homolog gene family, member F (in filopodia)	1,2
TSC1	tuberous sclerosis 1	1,2
<b>Réponse immunitaire</b>		
CD24	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	5,6
ULBP2	UL16 binding protein 2	2,4
SEMA4D	sema domain (semaphorin) 4D	2,3
CCR4	chemokine (C-C motif) receptor 4	1,9
BRDG1	BCR downstream signaling 1	1,8
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	1,3
<b>Transport des protéines</b>		
BRDG1	BCR downstream signaling 1	1,8
STX7	Syntaxin 7	1,2
VPS16	vacuolar protein sorting 16 (yeast)	1,2
COPE	coatamer protein complex, subunit epsilon	1
<b>Divers</b>		
DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	8,1
HIST1H2BG	histone 1, H2bg	8
C1S	complement component 1, s subcomponent	7,1
RPL3L	ribosomal protein L3-like	6,5
FTCD	formiminotransferase cyclodeaminase	6,4
CYP4F3	cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 3	6,2
RCN3	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain	5,2
RIS1	Ras-induced senescence 1	5,2

<sup>a</sup> Rapport des intensités d'hybridation en log<sub>2</sub>.

**Tableau 6. Gènes sous-exprimés dans les cellules U1 et ACH2 stimulées par le NaB par rapport aux cellules non traitées.**

Symbol	Nom	U1 NaB vs. ACH2 NaB	
		U1 <sup>a</sup>	vs. ACH2 <sup>a</sup>
<b>Transcription</b>			
FLI1	Friend leukemia virus integration 1	-7,8	-2,4
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	-4,8	-4,8
NMI	N-myc (and STAT) interactor	-4,2	-4,3
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	-3,8	-2,8
TOE1	target of EGR1, member 1 (nuclear)	-3,7	-1,6
ZNF278	zinc finger protein 278	-3,6	-2,4
CHD3	chromodomain helicase DNA binding protein 3	-3	-3,4
SATB1	special AT-rich sequence binding protein 1	-3	-2,9
PHF11	PHD finger protein 11	-3	-1,8
PRKCBP1	protein kinase C binding protein 1	-2,7	-4,3
IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	-2,7	-2,7
PHF2	PHD finger protein 2	-2,6	-1,5
<b>Transduction du signal</b>			
IL27RA	interleukin 27 receptor, alpha	-4,5	-3,1
ADRBK1	adrenergic, beta, receptor kinase 1	-3,8	-2,9
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	-3	-1,3
ARHGAP4	Rho GTPase activating protein 4	-2,9	-2,4
ITPKB	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B	-2,8	-2
IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	-2,7	-2,7
LRP8	low density lipoprotein receptor-related protein 8	-2,5	-1,7
IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma	-2,4	-2,6
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	-2,4	-2,1
HDGF	hepatoma-derived growth factor (high-mobility group protein-like)	-2,3	-1,9
EVL	Enah/Vasp-like	-2,3	-1,7
PTPRC	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	-2,2	-3,4
<b>Réponse immunitaire</b>			
LCP2	lymphocyte cytosolic protein 2	-6,9	-3,2
PSMB8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8	-2,8	-3,4
PSMB10	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10	-2	-2,9
TAPBP	TAP binding protein (tapasin)	-2	-1,8
CTSC	cathepsin C	-1,9	-2,1
IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	-1,9	-1,4
<b>Modification des ARN</b>			
QTRT1	queuine tRNA-ribosyltransferase 1	-4,1	-2,7
CUGBP2	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	-3,7	-2,2
PUS1	pseudouridylate synthase 1	-2,5	-2
HNRPUL1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	-2,4	-1,6
HNRPH3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)	-2,3	-2,2
FLJ20244	hypothetical protein FLJ20244	-2,1	-2,8
C2F	C2f protein	-2	-1,8
<b>Divers</b>			
MLSTD1	male sterility domain containing 1	-5,8	-2,8
LRMP	lymphoid-restricted membrane protein	-5,7	-2,1
BDH	3-hydroxybutyrate dehydrogenase (heart, mitochondrial)	-5,3	-2,6
DOCK10	dedicator of cytokinesis 10	-4,7	-2,1
LOC150759	hypothetical protein LOC150759	-4,5	-2
CAS1	O-acetyltransferase	-4,4	-2,2
FMNL1	formin-like 1	-4,2	-4,2

<sup>a</sup> Rapport des intensités d'hybridation en log<sub>2</sub>.

**Tableau 7. Gènes sous-exprimés dans les cellules U1 stimulées par le NaB par rapport aux cellules non traitées.**

Symbol	Nom	U1 NaB vs. U1 <sup>a</sup>
<b>Transcription</b>		
SPI1	spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1	-5,3
ZFHX1B	zinc finger homeobox 1b	-4,6
ELF4	E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)	-4,3
HLF	hepatic leukemia factor	-4,2
POU2F2	POU domain, class 2, transcription factor 2	-4,1
GFI1	growth factor independent 1	-3,6
NFE2	nuclear factor (erythroid-derived 2), 45kDa	-3
MNDA	myeloid cell nuclear differentiation antigen	-2,7
MAFG	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G (avian)	-2,6
SHOX2	short stature homeobox 2	-2,6
STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A	-2,6
<b>Transduction du signal</b>		
RAB33A	RAB33A, member RAS oncogene family	-3,7
CIAS1	cold autoinflammatory syndrome 1	-3,4
CLECSF5	C-type (calcium dependent) lectin, superfamily member 5	-3,4
NSMAF	neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor	-3,3
IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein	-3,1
CIDEB	cell death-inducing DFFA-like effector b	-2,9
PYCARD	PYD and CARD domain containing	-2,8
RGS19	regulator of G-protein signalling 19	-2,5
TLR2	toll-like receptor 2	-2,5
IL4R	interleukin 4 receptor	-2,4
MAPKAPK3	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	-2,4
<b>Réponse immunitaire</b>		
EBI2	Epstein-Barr virus induced gene 2	-5,5
FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for	-4,1
IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein	-3,1
HLA-DOB	major histocompatibility complex, class II, DO beta	-3
LILRA2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A, member 2	-2,9
LY64	lymphocyte antigen 64 homolog, radioprotective 105kDa (mouse)	-2,6
CST7	cystatin F (leukocystatin)	-2,5
FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor for (CD64)	-2,3
MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	-2,1
<b>Modification des ARN</b>		
NXF3	nuclear RNA export factor 3	-3
RPP40	ribonuclease P 40kDa subunit	-1,7
SEN2L	likely homolog of yeast SEN2	-1,6
FLJ20485	hypothetical protein FLJ20485	-1,4
RBM5	RNA binding motif protein 5	-1,4
<b>Divers</b>		
TARP	TCR gamma alternate reading frame protein	-6,9
LOC146712	hypothetical protein LOC146712	-6,6
FLJ22457	hypothetical protein FLJ22457	-5,5
FES	feline sarcoma oncogene	-5,4
MFAP4	microfibrillar-associated protein 4	-5,2
TFEC	transcription factor EC	-5

<sup>a</sup> Rapport des intensités d'hybridation en log<sub>2</sub>.

**Tableau 8. Gènes sous-exprimés dans les cellules ACH2 stimulées par le NaB par rapport aux cellules non traitées.**

Symbol	Nom	ACH2 NaB vs. ACH2 <sup>a</sup>
<b>Transcription</b>		
WT1	Wilms tumor 1	-4,6
GABPB2	GA binding protein transcription factor, beta subunit 2, 47kDa	-4,1
ZHX2	zinc fingers and homeoboxes 2	-3,4
ERG	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene like (avian)	-3,1
NKX2-5	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)	-3,1
IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	-3
MBD3	methyl-CpG binding domain protein 3	-3
LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1	-2,8
UBTF	upstream binding transcription factor, RNA polymerase I	-2,8
MYCN	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived	-2,7
RHOH	ras homolog gene family, member H	-2,7
GTF2I	general transcription factor II, i	-2,6
TOX	thymus high mobility group box protein TOX	-2,3
BCL11B	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)	-2,2
<b>Transduction du signal</b>		
TRIM	T-cell receptor interacting molecule	-6,5
TP53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	-3,1
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	-2,8
SIT	SHP2-interacting transmembrane adaptor protein	-2,8
GTF2I	general transcription factor II, i	-2,6
CD3Z	CD3Z antigen, zeta polypeptide (TiT3 complex)	-2,4
VAV3	vav 3 oncogene	-2,4
CD3G	CD3G antigen, gamma polypeptide (TiT3 complex)	-2,2
SPRY1	sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)	-2,1
TNFRSF6	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	-2
TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	-1,7
<b>Réponse immunitaire</b>		
ARTS-1	type 1 tumor necrosis factor receptor shedding aminopeptidase regulator	-5,3
IGLL1	immunoglobulin lambda-like polypeptide 1	-4,3
ZAP70	zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa	-2,8
GZMA	granzyme A (cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	-2,5
LOC91316	similar to bK246H3.1 (immunoglobulin lambda-like polypeptide 1)	-2,3
TRB	T cell receptor beta locus	-2,3
NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)	-2
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	-1,6
<b>Modification des ARN</b>		
IMP-3	IGF-II mRNA-binding protein 3	-1,9
TARBP1	TAR (HIV) RNA binding protein 1	-1,2
FMR1	fragile X mental retardation 1	-1,1
HNRPR	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	-1,1
HNRPU	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)	-1,1
<b>Divers</b>		
LRAP	leukocyte-derived arginine aminopeptidase	-5,2
SH2D1A	SH2 domain protein 1A, Duncan's disease (lymphoproliferative syndrome)	-5,1
STAG3	stromal antigen 3	-5
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	-4,8
MICAL-L1	MICAL-like 1	-4,6
C18orf1	chromosome 18 open reading frame 1	-4,5

<sup>a</sup> Rapport des intensités d'hybridation en log<sub>2</sub>.

**Tableau 9. Expression différentielle des gènes *NCoA3* et *IRF8* dans les cellules U1 (A) et ACH2 (B) traitées ou non par le NaB.**

A	Gene	Probe set Name <sup>a</sup>	U1 Signal <sup>b</sup>	U1 Detection p-value <sup>c</sup>	U1 NaB Signal	U1 NaB Detection p-value	U1 NaB vs. U1 Signal log <sub>2</sub> ratio <sup>d</sup>	U1 NaB vs. U1 Change p-value <sup>e</sup>
			207700_s_at	17,7	0,01416	98,9	0,000244	2,5
		209060_x_at	16,9	0,171387	77,2	0,000244	2,3	0,000023
	<i>NCoA3</i>	209061_at	48,4	0,037598	166,4	0,000732	2,3	0,00002
		209062_x_at	6,3	0,72583	91,8	0,010742	4,5	0,000147
		211352_s_at	7,2	0,303711	68,6	0,00293	3,2	0,000101
	<i>IRF8</i>	204057_at	707,9	0,000244	47	0,010742	-4	0,99998

B	Gene	Probe set Name	ACH2 Signal	ACH2 Detection p-value	ACH2 NaB Signal	ACH2 NaB Detection p-value	ACH2 NaB vs. ACH2 Signal log <sub>2</sub> ratio	ACH2 NaB vs. ACH2 Change p-value
			207700_s_at	43,3	0,001953	99,6	0,001221	1,2
		209060_x_at	34,5	0,01416	72,9	0,001953	1	0,000273
	<i>NCoA3</i>	209061_at	65,8	0,000732	82,6	0,000732	1,6	0,005409
		209062_x_at	20	0,466064	76,7	0,095215	2	0,000114
		211352_s_at	2,7	0,5	37	0,030273	3,8	0,004481

<sup>a</sup> Référence Affymetrix U133-A.

<sup>b</sup> Intensité du signal d'hybridation.

<sup>c</sup> Valeur p du signal de détection, p-value < 0,048 pour une hybridation spécifique.

<sup>d</sup> Rapport des intensités d'hybridation en log<sub>2</sub> ≥ 1 pour les gènes surexprimés

et ≤ -1 pour les gènes sous-exprimés.

<sup>e</sup> Valeur p de la variation d'expression, change p-value < 0,0001 pour une augmentation spécifique et 1-change p-value > 0,9998 pour une diminution spécifique.

gènes impliqués dans la transcription, la transduction du signal, la réponse immunitaire, le transport des protéines et diverses fonctions dont l'expression est augmentée dans les cellules traitées par le NaB par rapport aux cellules non traitées sont indiqués dans le **Tableau 3** (gènes surexprimés à la fois dans les cellules U1 NaB et ACH2 NaB), le **Tableau 4** (gènes surexprimés spécifiquement dans les cellules U1 NaB), et le **Tableau 5** (gènes surexprimés spécifiquement dans les cellules ACH2 NaB). Quelques gènes impliqués dans la transcription, la transduction du signal, la réponse immunitaire, la modification des ARN et diverses fonctions dont l'expression est diminuée dans les cellules traitées par le NaB par rapport aux cellules non traitées sont indiqués dans le **Tableau 6** (gènes sous-exprimés à la fois dans les cellules U1 NaB et ACH2 NaB), le **Tableau 7** (gènes sous-exprimés spécifiquement dans les cellules U1 NaB), et le **Tableau 8** (gènes sous-exprimés spécifiquement dans les cellules ACH2 NaB).

L'exploitation des données Affymetrix, concernant l'expression transcriptionnelle des gènes de cellules infectées de façon latente et stimulées ou non par le NaB, nous a permis de sélectionner plusieurs gènes potentiellement impliqués dans la latence du VIH-1. L'analyse des données nous a également permis d'identifier des gènes qui ont été précédemment associés à la réplication du VIH-1 ou à la latence, comme CDK9 (Simmons et al., 2001), c-Jun (Simmons et al., 2001; Van 't Wout et al., 2003), PSMB10 (« Proteasome Subunit,  $\beta$ -type 10 ») (Krishnan and Zeichner, 2004), MAPK1 (Chun et al., 2003), OAS1 (« 2'-5' Oligoadenylate Synthetase 1 ») (Bosinger et al., 2004), ce qui confirme la fiabilité de notre approche.

Parmi les gènes caractérisés, deux nous ont paru particulièrement intéressants : il s'agit des gènes *NCoA3* et *IRF8*. L'expression du gène *NCoA3* est augmentée après stimulation des cellules infectées de façon latente U1 et ACH2 par le NaB (**Tableau 9**). Le gène *IRF8* est très fortement exprimé dans les cellules U1 et son expression est diminuée après traitement par le

NaB (**Tableau 9**). Les variations transcriptionnelles observées pour ces deux gènes nous ont conduit à nous y intéresser dans le contexte de la latence du VIH-1.

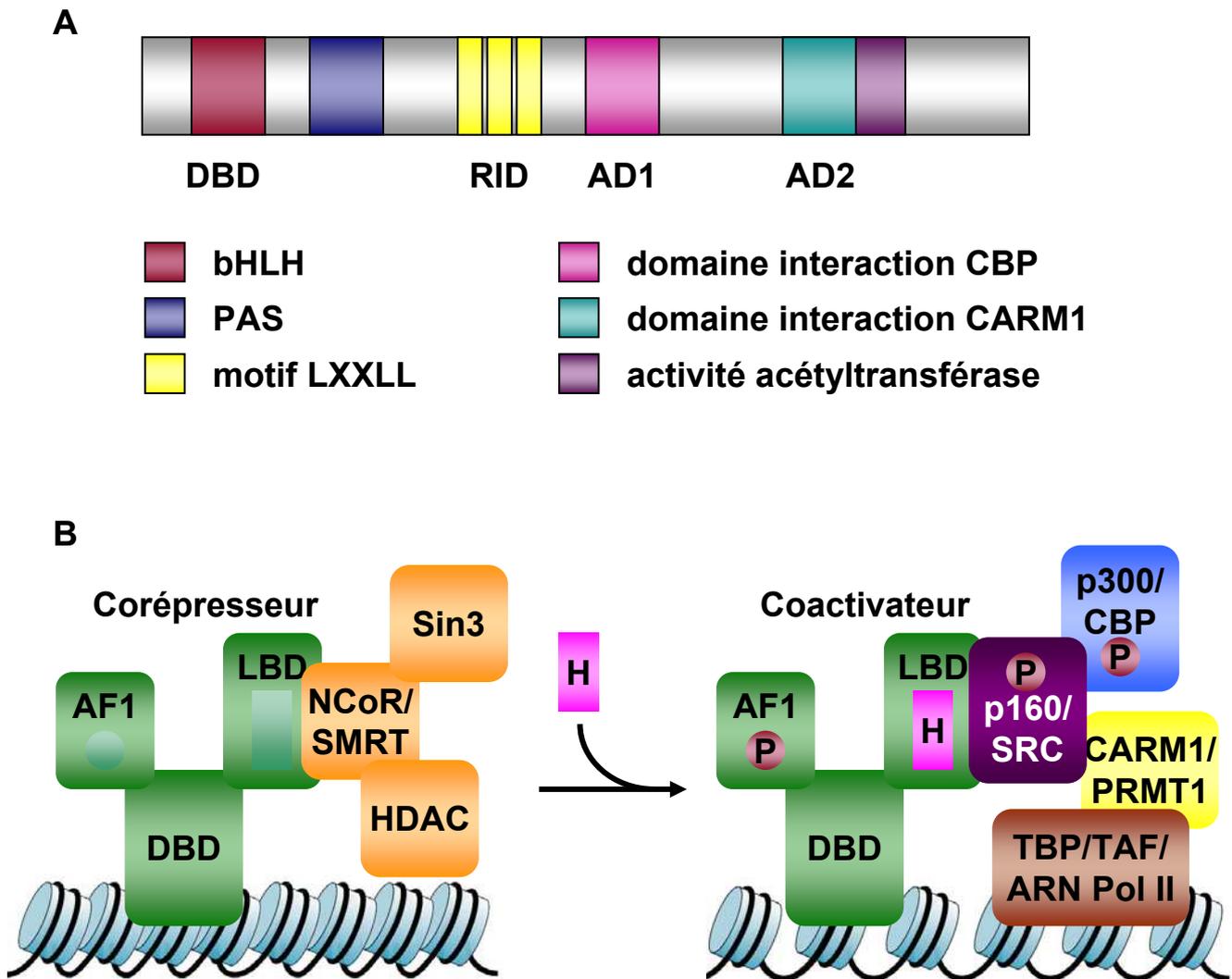
## **2.3. Analyse de l'implication du gène *NCoA3* dans la réactivation de la latence du VIH-1**

### **2.3.1. NCoA3 : Nuclear Receptor Coactivator 3**

Le gène *NCoA3* (« Nuclear Receptor Coactivator 3 ») appartient à la famille p160/SRC des coactivateurs de récepteurs nucléaires (« p160/Steroid Receptor Coactivator ») (pour revue (Xu and Li, 2003)). La famille p160/SRC comporte les protéines NCoA1 (ou SRC1, « Steroid Receptor Coactivator 1 »), NCoA2 (ou SRC2, « Steroid Receptor Coactivator 2 ») et NCoA3 (ou SRC3, « Steroid Receptor Coactivator 3 », ou p/CIP, « p300/CBP interacting protein p/CIP », ou RAC3, « Receptor-Associated Coactivator 3 », ou ACTR, ou AIB1 « Amplified in Breast Cancer 1 », ou TRAM1, « Thyroid Hormone Receptor Activator Molecule 1 »). Le gène *NCoA3* est nécessaire à la croissance des cellules somatiques et joue un rôle dans l'oncogenèse (pour revue (Liao et al., 2002)).

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription dont l'activité est inductible par la fixation de l'hormone et régulée par des corégulateurs (pour revue (McKenna and O'Malley, 2002)). Les récepteurs nucléaires comportent un domaine N-terminal d'activation AF-1 (« ligand independant Activation Function 1 »), un domaine de fixation à l'ADN DBD (« DNA Binding Domain ») suivi d'un domaine de fixation au ligand LBD (« Ligand Binding Domain ») et d'un domaine AF-2.

Les protéines de la famille p160/SRC comportent une région N-terminale bHLH/PAS contenant le domaine de fixation à l'ADN, une région centrale contenant 3 motifs conservés de type LXXLL formant le domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires RID (« Receptor Interaction Domain »), et deux domaines d'activation transcriptionnelle AD1 et



**Figure 39. Structure et fonction des coactivateurs de récepteurs nucléaires de la famille p160/SRC.**

**(A) Structure des coactivateurs de récepteurs nucléaires.** Les principaux domaines sont représentés : le domaine N-terminal de fixation à l'ADN (DBD), la région centrale d'interaction avec les récepteurs nucléaires (RID), les deux domaines d'activation (AD1 et AD2) responsables des interactions avec CBP et CARM1 respectivement, et le domaine à activité acétyltransférase (NCoA1 et NCoA3).

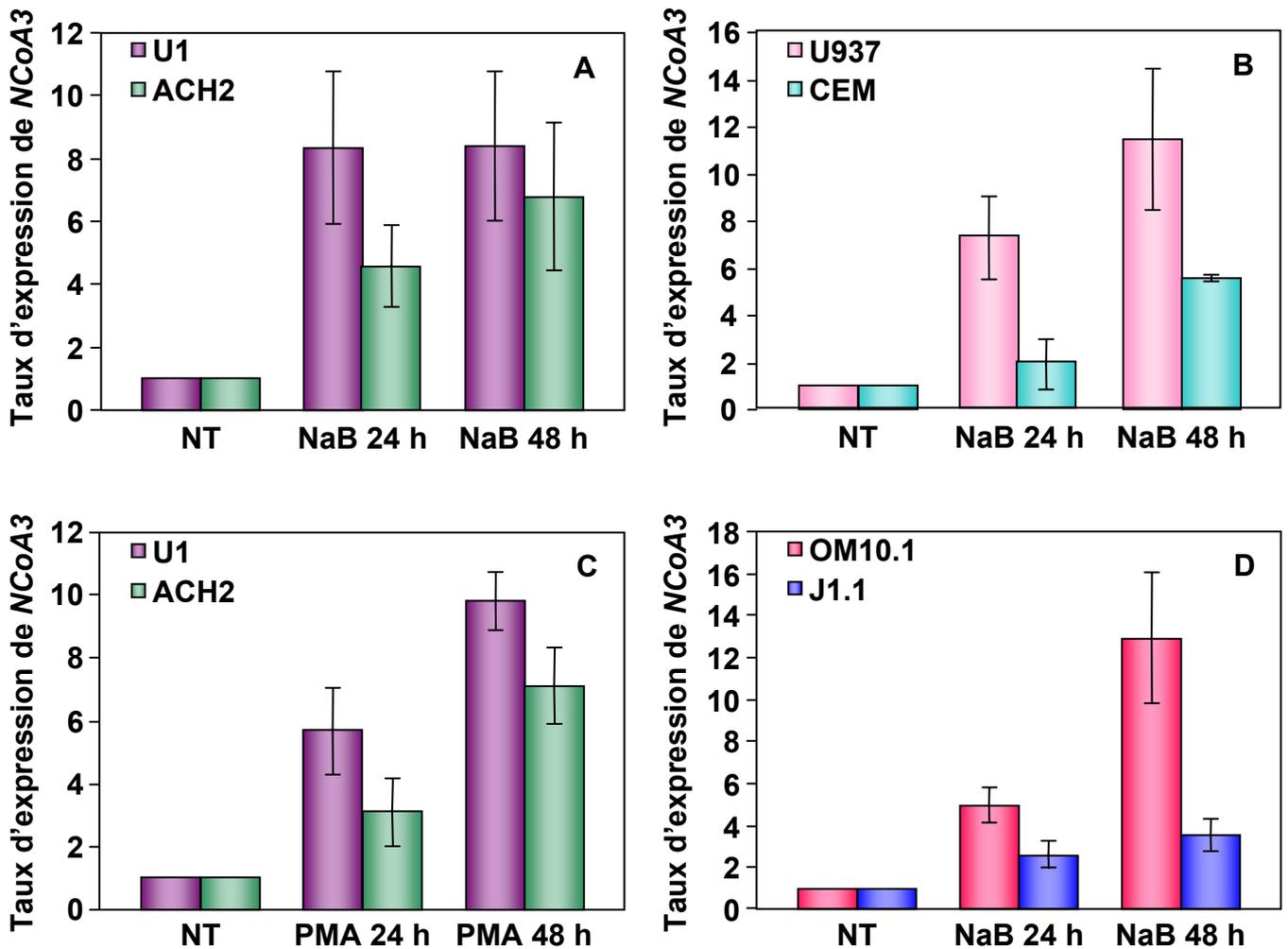
**(B) Fonction des coactivateurs de récepteurs nucléaires.** Le récepteur nucléaire se fixe à l'ADN *via* son domaine DBD et son activité transcriptionnelle est réprimée en absence de ligand par le recrutement des corépresseurs NCoR/SMRT, Sin3 et d'HDAC. La fixation de l'hormone (H) sur le domaine de fixation du ligand (LBD) permet le recrutement des complexes coactivateurs de la famille p160/SRC et l'activation de la transcription *via* le remodelage de la chromatine (recrutement des HAT p300/CBP et des HMT CARM1/PRMT1) et l'assemblage des facteurs généraux de transcription (TBP/TAF/ARN polymérase II).

AD2 (« Activation Domain ») localisés à l'extrémité C-terminale et responsables de l'interaction avec les HAT p300/CBP, P/CAF et GCN5 et les HMT CARM1 et PRMT1, respectivement (**Figure 39A**). De plus, NCoA1 et NCoA3 possèdent une activité histone acétyltransférase intrinsèque (Chen et al., 1997) (**Figure 39A**).

En absence de ligand, la transcription basale du gène cible du récepteur nucléaire est réprimée *via* le recrutement des corépresseurs SMRT (« Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors ») et NCoR (« Nuclear Corepressor ») qui forment un complexe avec le corépresseur Sin3 et des histone déacétylases (**Figure 39B**). La fixation du ligand entraîne la dissociation des complexes corépresseurs et le recrutement des complexes coactivateurs. Les complexes coactivateurs augmentent la transcription des gènes cibles en permettant le remodelage de la chromatine et l'assemblage des facteurs généraux de transcription (pour revue (McKenna and O'Malley, 2002)). Le remodelage de la chromatine est accompli par le recrutement direct des protéines histones acétyltransférases p300/CBP et p/CAF et des protéines histones méthyltransférases CARM1 et PRMT1. L'acétylation et la méthylation d'histones spécifiques facilitent l'accès du complexe de pré-initiation de la transcription et conduit à une activation transcriptionnelle (pour revues (Leo and Chen, 2000; Xu and Li, 2003)) (**Figure 39B**).

L'activité des protéines de la famille p160/SRC peut être régulée par des modifications post-traductionnelles comme l'acétylation par p300/CBP (Chen et al., 1999) et la phosphorylation (Wu et al., 2004) notamment par le complexe I $\kappa$ B kinase (Wu et al., 2002). De plus, NCoA1 et NCoA3 sont des coactivateurs du facteur NF $\kappa$ B (Na et al., 1998; Werbajh et al., 2000).

Le gène *NCoA3* étant surexprimé lors de la stimulation des cellules U1 et ACH2 par le NaB, NCoA3 pourrait être impliqué dans la réactivation de la latence virale. En effet, la



**Figure 40. Analyse de l'expression des ARNm *NCoA3* par RT-PCR quantitative.**

Les ARN des cellules U1 et ACH2 (A et C), U937 et CEM (B), et OM10.1 et J1.1 (D) ont été extraits après 24 et 48 h de traitement par le NaB (A, B et D) ou par le PMA (C). L'expression du gène *NCoA3* a été quantifiée par RT-PCRq et normalisée par rapport à l'expression du gène *cyclophiline A*. Le taux d'expression du gène *NCoA3* est déterminé par rapport aux cellules non traitées (NT). Ces résultats représentent la moyenne du taux d'expression mesuré par PCRq en double à partir d'ARN extraits d'au moins deux stimulations indépendantes.

surexpression de NCoA3 pourrait participer au déverrouillage de la chromatine nécessaire à l'expression transcriptionnelle du génome viral.

### 2.3.2. Modification de l'expression du gène *NCoA3* dans les cellules infectées de façon latente et stimulées par le NaB

#### 2.3.2.1. Expression des ARNm *NCoA3*

Les résultats obtenus après hybridation sur micropuces concernant les modifications de l'expression du gène *NCoA3* dans les cellules U1 et ACH2 traitées ou non par le NaB sont donnés dans le **Tableau 9**. L'expression du gène *NCoA3* (Unigene Hs. 382168) est augmentée de façon significative de 4,9 à 22,6 fois (rapport des intensités d'hybridation en  $\log_2$  U1 NaB vs. U1 variant de 2,3 à 4,5 avec une valeur  $p < 0,00015$ ) après stimulation des cellules U1 par le NaB (**Tableau 9A**). De même, l'expression du gène *NCoA3* est augmentée dans les cellules ACH2 traitées par le NaB par rapport aux cellules non traitées de 2 à 13,9 fois mais de façon moins significative (rapport des intensités d'hybridation en  $\log_2$  ACH2 NaB vs. ACH2 variant de 1 à 3,8 avec une valeur  $p < 0,0055$ ) (**Tableau 9B**). L'expression du gène *NCoA3* est donc augmentée lors de la réactivation de la latence des cellules U1 et ACH2 par le NaB.

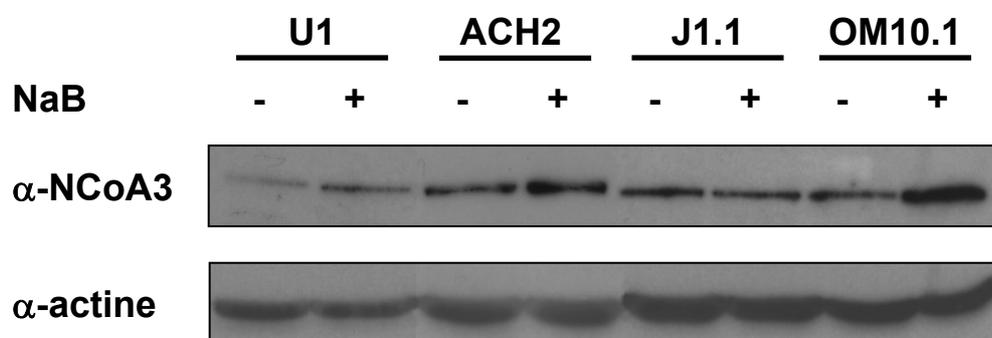
La modification de l'expression du gène *NCoA3* a été validée par des expériences de RT-PCR quantitative. Cinq traitements indépendants de cellules U1 et ACH2 par le NaB ont été réalisés et les ARN ont été extraits après 24 et 48 h. Une PCRq *NCoA3* et une PCRq *cyclophiline A* ont été réalisées en double à partir des ADNc synthétisés. L'expression du gène *NCoA3* a été normalisée par rapport à l'expression du gène *cyclophiline A*. La **Figure 40A** représente le taux d'activation de l'expression du gène *NCoA3* dans les cellules U1 et ACH2 traitées par le NaB pendant 24 et 48 h par rapport aux cellules non traitées. Nous observons une surexpression de l'ARNm *NCoA3* dans les cellules U1 stimulées par le NaB de  $8,34 \pm 2,42$  fois par rapport aux cellules non stimulées (**Figure 40A**). L'expression du gène *NCoA3* augmente également après 48 h de traitement par le NaB (surexpression de  $8,40 \pm$

2,33 fois) (**Figure 40A**). De façon similaire, nous observons une augmentation de l'expression du gène *NCoA3* dans les cellules ACH2 après traitement par le NaB (surexpression de  $4,56 \pm 1,28$  fois après 24 h et surexpression de  $6,80 \pm 2,34$  fois après 48 h de traitement) (**Figure 40A**). Les résultats obtenus avec les expériences de RT-PCRq confirment ceux obtenus avec les hybridations sur micropuces. La modification d'expression transcriptionnelle du gène *NCoA3* est donc validée.

Nous avons voulu déterminer si l'expression du gène *NCoA3* était modifiée de la même façon après traitement par le NaB des cellules parentales non infectées U937 et CEM. Le gène *NCoA3* est également surexprimé dans les cellules U937 (surexpression de  $7,32 \pm 1,74$  fois après 24 h et surexpression de  $11,45 \pm 2,95$  fois après 48 h de traitement) et CEM (surexpression de  $1,93 \pm 1,04$  fois après 24 h et surexpression de  $5,59 \pm 0,06$  fois après 48 h de traitement) traitées par le NaB (**Figure 40B**).

Nous avons réalisé des expériences supplémentaires afin de déterminer si les variations d'expression du gène *NCoA3* pouvaient être observées après traitement des cellules par l'ester de phorbol PMA et par un autre inhibiteur d'HDAC, la trichostatine A (TSA). L'expression du gène *NCoA3* est augmentée après traitement par le PMA des cellules U1 (surexpression de  $5,70 \pm 1,37$  fois après 24 h et surexpression de  $9,85 \pm 0,90$  fois après 48 h de traitement) et ACH2 (surexpression de  $3,12 \pm 1,05$  fois après 24 h et surexpression de  $7,12 \pm 1,20$  fois après 48 h de traitement) (**Figure 40C**). Le traitement par la TSA n'a pas d'effet sur l'expression du gène *NCoA3* dans les cellules U1 et ACH2 (résultat non montré). L'expression du gène *NCoA3* est augmentée après traitement des cellules U1 et ACH2 par un ester de phorbol mais pas par un autre inhibiteur d'HDAC.

Nous avons également analysé l'expression différentielle du gène *NCoA3* dans deux autres lignées cellulaires infectées de façon latente par le VIH-1 : la lignée promonocytaire OM10.1 (Butera et al., 1991) et la lignée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> J1.1 (Perez et al., 1991).



**Figure 41. Analyse de l'expression de la protéine NCoA3 par Western-Blot.**

Les extraits nucléaires (100  $\mu$ g) des cellules U1, ACH2, OM10.1 et J1.1 traitées (+) ou non (-) par le NaB pendant 24 h ont été séparés sur gel SDS-PAGE à 8% et transférés sur membrane. La protéine NCoA3 est détectée à l'aide d'un anticorps  $\alpha$ -NCoA3 (en haut). La quantité de protéines a été normalisée en utilisant un anticorps  $\alpha$ -actine (en bas). Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

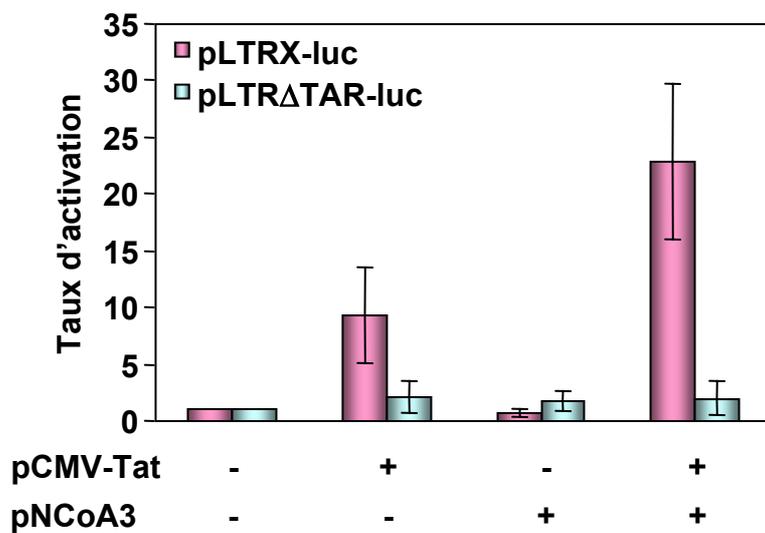
Les cellules OM10.1 et J1.1 ont été ou non traitées pendant 24 et 48 h par du NaB et des RT-PCRq ont été réalisées sur les ARN extraits pour mesurer l'expression du gène *NCoA3* (**Figure 40D**). L'expression du gène *NCoA3* est augmentée de  $4,94 \pm 0,78$  fois dans les cellules OM10.1 et de  $2,56 \pm 0,64$  fois dans les cellules J1.1 après 24 h de traitement par le NaB (**Figure 40D**). L'expression du gène *NCoA3* augmente avec le temps de traitement par le NaB dans les deux lignées cellulaires (surexpression de  $12,89 \pm 3,10$  fois dans les cellules OM10.1 et surexpression de  $3,51 \pm 0,69$  fois dans les cellules J1.1) (**Figure 40D**). L'expression différentielle du gène *NCoA3* est donc similaire dans deux autres modèles de lignées cellulaires infectées de façon latente par le VIH-1.

#### 2.3.2.2. Expression de la protéine *NCoA3*

Nous avons ensuite voulu confirmer que les modifications observées au niveau des ARNm de *NCoA3* corrélaient avec l'expression de la protéine NCoA3. Nous avons réalisé des extraits nucléaires de cellules U1, ACH2, OM10.1 et J1.1 traitées ou non pendant 24 h par du NaB. Les protéines nucléaires ont été séparées sur gel SDS-PAGE puis la protéine NCoA3 a été révélée par un anticorps spécifique (**Figure 41**). Les quantités de protéines déposées ont été normalisées par hybridation avec un anticorps dirigé contre l'actine. Les résultats montrent que le NaB augmente l'expression de la protéine NCoA3 dans les cellules U1, ACH2, OM10.1 et de façon moindre dans les cellules J1.1 (**Figure 41**). Ces résultats corrélaient avec l'expression différentielle du gène *NCoA3* observée par les expériences d'hybridation sur micropuces et de RT-PCRq. L'expression de la protéine NCoA3 est donc augmentée après traitement des cellules infectées de façon latente par le NaB.

#### 2.3.3. Transactivation du LTR par Tat et NCoA3

Nous avons ensuite analysé le rôle fonctionnel de NCoA3 sur la transcription du promoteur viral par des expériences de transfection. Nous avons co-transfecté le plasmide permettant l'expression du gène *NCoA3* (Anzick et al., 1997) dans des cellules HEK293 avec



**Figure 42. NCoA3 augmente la transactivation de la transcription du LTR par Tat.**

Les cellules HEK293 ont été co-transfectées avec les plasmides pLTRX-luc (10 ng) ou pLTRΔTAR-luc (10 ng) avec (+) ou sans (-) des quantités sub-optimales des vecteurs d'expression pCMV-Tat (5 ng) et/ou pNCoA3 (1 μg). L'index luciférase normalisé (activité luciférase / activité β-galactosidase) est mesuré après 24 h de transfection et le taux d'activation est déterminé par rapport à l'activité basale du plasmide pLTR-luc correspondant. Ces résultats représentent la moyenne de cinq expériences indépendantes.

un plasmide rapporteur pLTRX-luc contenant le gène *luciférase* sous le contrôle de la région U3-R du promoteur du VIH-1 (nt -640 à +78) et en présence ou en absence d'un plasmide permettant l'expression de la protéine virale Tat (**Figure 42**).

L'expression de la protéine Tat transactive la transcription du promoteur viral de  $9,4 \pm 4,2$  fois, comme attendu. L'expression de NCoA3 en absence de la protéine virale Tat n'a aucun effet sur l'activité transcriptionnelle basale du promoteur viral. En revanche, en présence de Tat et de NCoA3, la transcription est activée de  $22,8 \pm 6,8$  fois. L'expression de NCoA3 augmente la transactivation de la transcription du LTR par Tat de  $2,8 \pm 1,4$  fois (**Figure 42**). La protéine NCoA3 exerce un effet synergique sur l'activité transcriptionnelle du LTR induite par une expression sub-optimale de la protéine Tat.

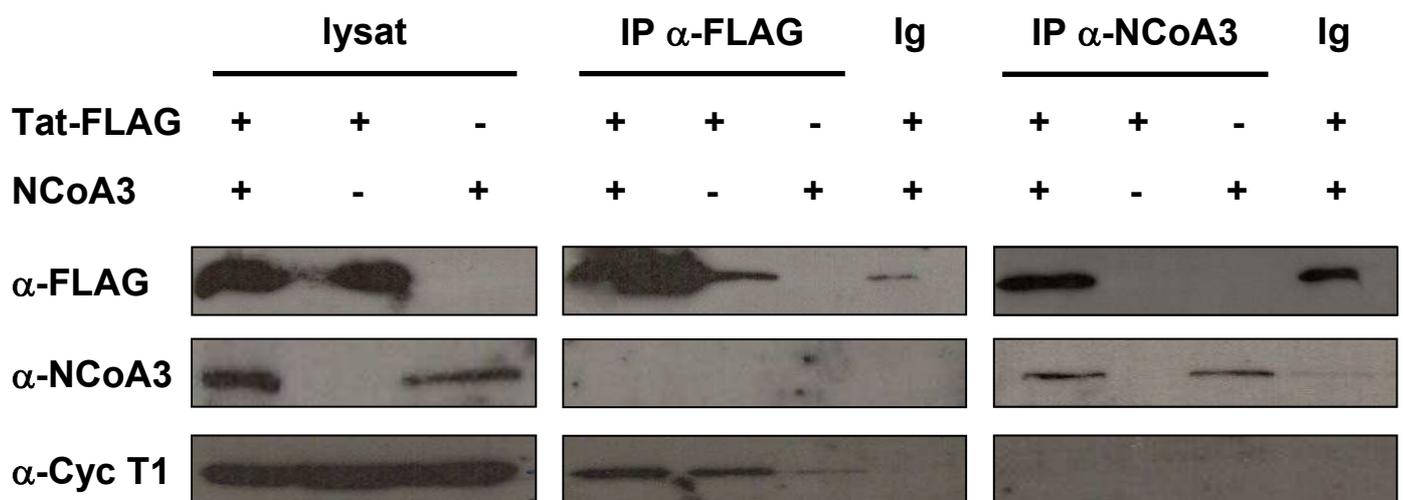
Lorsque les cellules HEK293 sont transfectées avec un plasmide rapporteur pLTR $\Delta$ TAR-luc délété de l'élément de réponse à la transactivation TAR, Tat n'est plus capable d'activer la transcription du LTR comme attendu, et NCoA3 n'a aucun effet sur l'activité transcriptionnelle du promoteur viral (**Figure 42**).

Nous avons montré que la transcription du promoteur viral en présence de la protéine virale transactivatrice Tat pouvait être augmentée par NCoA3 et que cet effet est dépendant de la présence de la région TAR.

#### 2.3.4. Etude des partenaires de NCoA3 sur le promoteur viral

Ayant observé, un effet synergique de NCoA3 et Tat dans l'activation de la transcription du LTR, nous avons voulu savoir si cet effet était dû à une interaction directe entre Tat et NCoA3. Nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitations sur des lysats totaux de cellules HEK293 transfectées par des plasmides exprimant NCoA3 et la protéine Tat marquée d'une étiquette FLAG (Tat-FLAG) seuls ou en combinaison (**Figure 43**).

Nous avons tout d'abord immunoprécipité la protéine Tat-FLAG (**Figure 43**, IP  $\alpha$ -FLAG) avec un anticorps anti-FLAG de souris et nous avons analysé les protéines co-



**Figure 43. Analyse de l'interaction potentielle entre Tat et NCoA3 par co-immunoprécipitation.**

Les immunoprécipitations ont été réalisées sur 2 mg de lysats totaux de cellules HEK293 transfectées par des plasmides exprimant (+) ou non (-) Tat-FLAG et/ou NCoA3. Les protéines Tat-FLAG et NCoA3 ont été immunoprécipitées avec un anticorps de souris anti-FLAG (IP  $\alpha$ -FLAG) et un anticorps de chèvre anti-NCoA3 (IP  $\alpha$ -NCoA3). Des Ig non spécifiques ont été testées sur 2 mg de lysat total de cellules doublement transfectées (témoin négatif). Les protéines immunoprécipitées ont été révélées par Western-Blot avec des anticorps anti-FLAG, anti-NCoA3 et anti-cycline T1.

immunoprécipitées par Western-Blot. Le témoin positif d'immunoprécipitation de la protéine Tat est validé, comme le montre l'hybridation avec l'anticorps  $\alpha$ -FLAG (**Figure 43**). Comme attendu, la cycline T1 co-immunoprécipite avec Tat (**Figure 43**,  $\alpha$ -Cyc T1). En revanche, il semblerait que NCoA3 ne co-immunoprécipite pas avec Tat comme le suggère l'hybridation avec l'anticorps  $\alpha$ -NCoA3 (**Figure 43**).

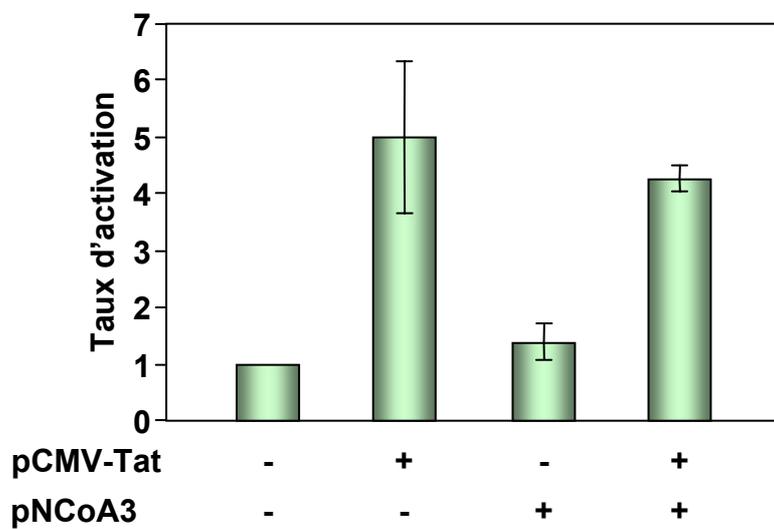
Nous avons ensuite réalisé l'immunoprécipitation de la protéine NCoA3 (**Figure 43**, IP  $\alpha$ -NCoA3) avec un anticorps anti-NCoA3 de chèvre et nous avons analysé les protéines co-immunoprécipitées par Western-Blot. Le témoin positif d'immunoprécipitation de la protéine NCoA3 est validé, comme le montre l'hybridation avec l'anticorps  $\alpha$ -NCoA3 (**Figure 43**). L'hybridation avec l'anticorps anti-FLAG ne montre pas de co-immunoprécipitation de la protéine Tat avec NCoA3 (**Figure 43**,  $\alpha$ -FLAG). Ceci confirme le résultat précédemment observé. De plus, NCoA3 ne semble pas interagir avec la cycline T1 (**Figure 43**,  $\alpha$ -Cyc T1).

Ces deux séries d'expériences semblent montrer que Tat et NCoA3 n'interagissent pas directement. L'interaction entre Tat et NCoA3 pourrait être indirecte mais ne semble pas faire intervenir la cycline T1.

### **2.3.5. Réactivation de la latence par expression de NCoA3 dans les cellules infectées ?**

Enfin, nous avons analysé si la surexpression de NCoA3 pouvait permettre la réactivation de la latence. Pour cela, nous avons transfecté les plasmides d'expression de NCoA3 et Tat dans les cellules U1 infectées de façon latente seuls ou en combinaison.

Les cellules U1 se transfectant difficilement, nous avons choisi d'utiliser le système de nucléofection Amaxa. Les cellules U1 ont été co-transfectées avec un plasmide GFP et l'efficacité de transfection a été évaluée par mesure de la fluorescence en cytométrie de flux (pourcentage de cellules transfectées variant de 15,3 à 28,8%, avec une moyenne d'intensité



**Figure 44. Analyse de l'expression des ARNm *gag* après transfection de Tat et/ou NCoA3 dans les cellules U1.**

Les cellules U1 ont été transfectées (+) ou non (-) avec les plasmides pCMV-Tat (50 ng) et/ou pNCoA3 (4,5 µg). Les ARN ont été extraits 48 h p.t. et des RT-PCRq *gag* et *cyclophiline A* ont été réalisées. Le taux d'activation est déterminé par rapport à l'expression des ARNm *gag/cyclophiline A* dans les cellules U1 transfectées avec 4,5 µg de vecteur pcDNA3.1. Ces résultats représentent la moyenne de 2 RT-PCRq.

de fluorescence passant de 0,346 pour les cellules non transfectées à 1,48-2,87 pour les cellules GFP selon le plasmide co-transfecté).

Les ARN ont été extraits 48 h après transfection et l'expression virale a été analysée par RT-PCRq *gag*. L'expression des ARNm *gag* a été normalisée par rapport à l'expression des ARNm *cyclophiline A* et à la moyenne d'intensité de fluorescence. Les taux d'activation par rapport aux cellules transfectées avec le vecteur pcDNA3.1 sont représentés **Figure 44**. La transfection de 50 ng de plasmide pTat dans les cellules U1 permet d'activer l'expression des ARNm *gag* de  $5 \pm 1,32$  fois, comme attendu (**Figure 44**). La transfection de 4,5  $\mu$ g de plasmide NCoA3 n'a pas d'effet sur la transcription des ARNm *gag* en absence de la protéine Tat (activation de  $1,38 \pm 0,31$ ) (**Figure 44**). En présence de Tat et de NCoA3, l'expression des ARNm *gag* est activée de  $4,27 \pm 0,24$  fois (**Figure 44**).

L'expression de NCoA3 ne semble pas augmenter l'activation de la transcription induite par Tat et ne permet pas réactiver l'expression virale dans les cellules U1.

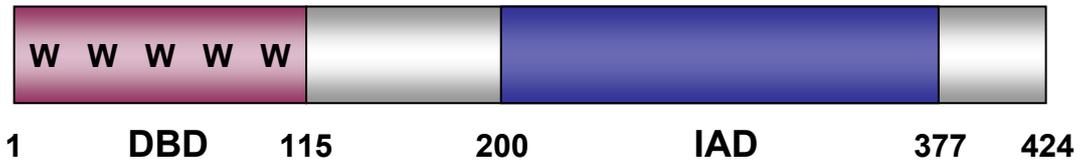
## **2.4. Analyse de l'implication du gène *IRF8* dans l'établissement et le maintien de la latence du VIH-1**

### **2.4.1. IRF8 : Interferon Regulatory Factor 8**

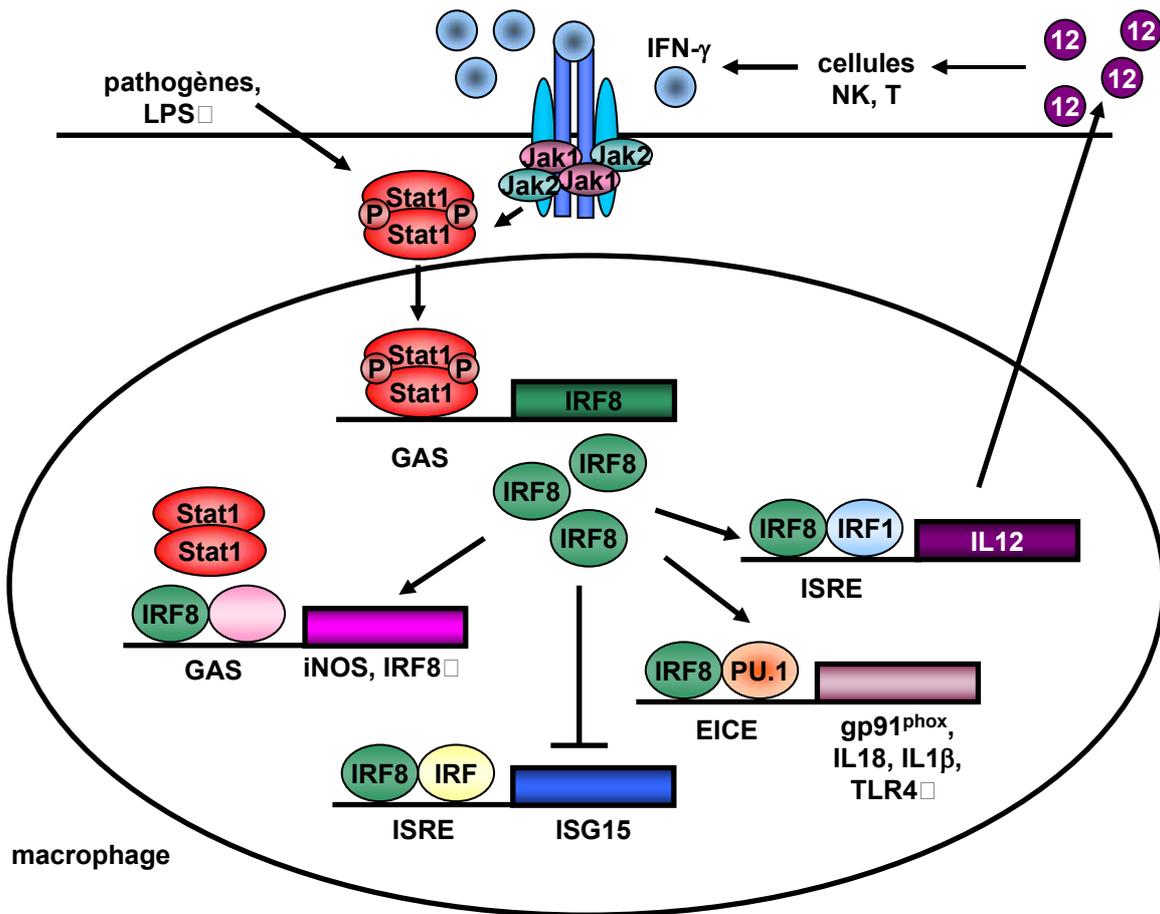
Le gène *IRF8* (« Interferon Regulatory Factor 8 ») appartient à la famille des facteurs de régulation de l'interféron ou IRF.

Les interférons de type I (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ), produits par les cellules infectées par des virus, et l'interféron de type II (IFN- $\gamma$ ), produit par les cellules T activées et les cellules NK, régulent la transcription de gènes cibles appelés ISG (« Interferon Stimulated Gene ») par la voie de signalisation JAK/STAT (« Signal Transducer and Activator of Transcription ») et les facteurs IRF (pour revue (Platanias, 2005)).

A



B



**Figure 45. Structure et fonction de la protéine IRF8.**

**(A) Structure de la protéine IRF8.** La protéine IRF8 est une protéine de 424 aa comportant un domaine N-terminal de fixation à l'ADN (DBD) contenant des répétitions de résidus tryptophanes (W) et un domaine d'association aux facteurs IRF (IAD) en C-terminal.

**(B) Fonction de la protéine IRF8.** L'expression d'IRF8 est induite dans les macrophages par l'IFN- $\gamma$  et la fixation d'homodimères de Stat1 sur le site GAS de son promoteur. IRF8 active ou réprime la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire, selon le partenaire avec lequel il interagit et le gène cible. L'induction d'IL12 permet la différenciation des cellules NK et Th1 qui sécrètent l'IFN- $\gamma$ . IRF8 induit également sa propre expression.

La famille des IRF regroupe les facteurs IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 et IRF9 (pour revue (Taniguchi et al., 2001)). L'expression des facteurs IRF est ubiquitaire ou restreinte aux cellules des lignées myéloïdes et lymphoïdes (IRF4 et IRF8) et est constitutive (IRF3 et IRF9) ou inductible par les IFN, les virus, et les cytokines. Les facteurs IRF se fixent sur des éléments appelés ISRE (« IFN Stimulated Response Element ») localisés sur les promoteurs des gènes cibles *via* leur domaine N-terminal conservé de fixation à l'ADN ou DBD. Les facteurs IRF sont des activateurs ou des répresseurs de la transcription des gènes ISG. Leur activité est régulée par des modifications post-traductionnelles et par des interactions avec des facteurs de transcription *via* leur domaine d'association aux IRF ou IAD (« IRF Association Domain »). Les facteurs IRF sont impliqués dans de nombreux processus biologiques dont la régulation de la réponse antivirale, la régulation des réponses immunitaires, le développement des cellules hématopoïétiques et la suppression ou la susceptibilité aux tumeurs (pour revue (Taniguchi et al., 2001)).

Le facteur IRF8 (ou ICSBP, « IFN Consensus Sequence Binding Protein ») est exprimé dans les cellules de la lignée monocytes/macrophages, les lymphocytes B et les lymphocytes T activés et son expression est induite par l'IFN- $\gamma$  (pour revue (Levi et al., 2002)). La fixation d'IFN- $\gamma$  sur le récepteur IFNGR induit l'activation des kinases Jak1 et Jak2 qui phosphorylent Stat1. L'homodimère de Stat1 appelé GAF (« IFN- $\gamma$  Activated Factor ») se fixe sur le site GAS (« IFN- $\gamma$  Activated Site ») présent sur le promoteur du gène *IRF8* (**Figure 45B**).

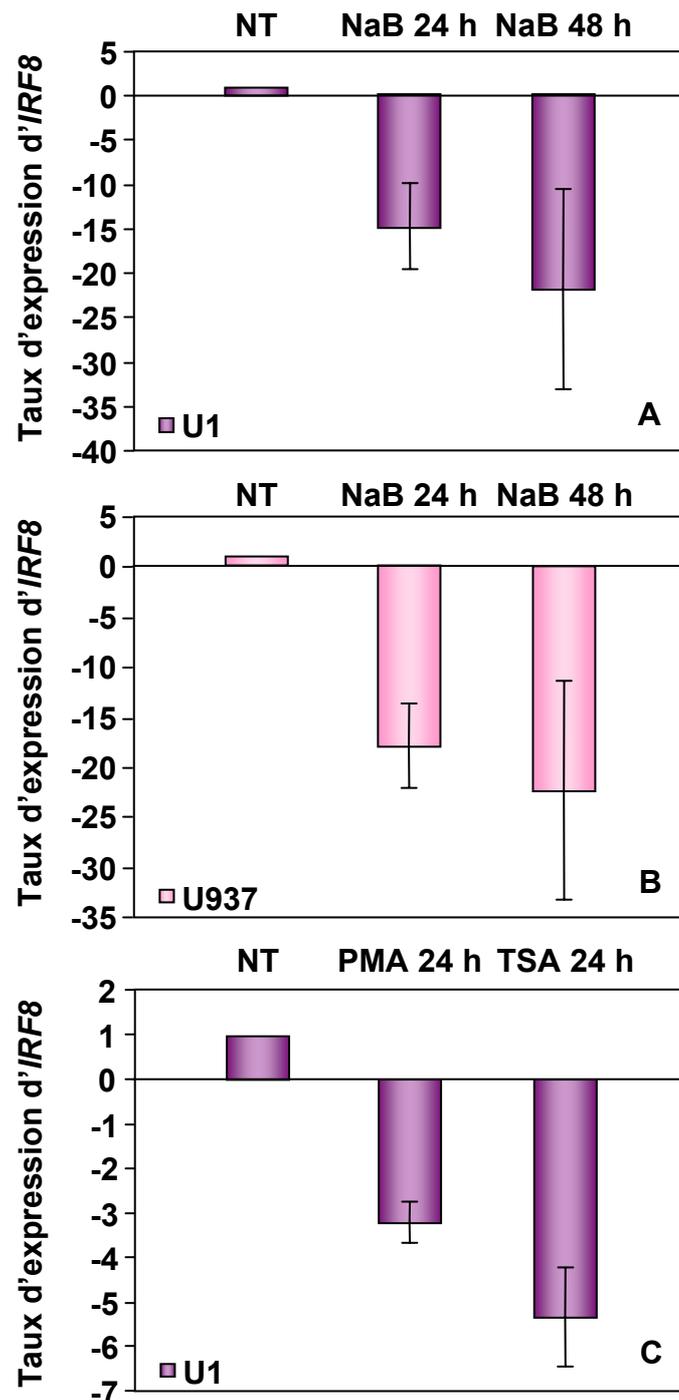
IRF8 a d'abord été identifié comme un régulateur négatif de promoteurs contenant un élément ISRE. Cependant, l'activité transcriptionnelle d'IRF8 est dictée par le promoteur et les partenaires avec lesquels il interagit selon qu'il s'agisse de protéines de la famille des IRF ou non. En effet, IRF8 réprime l'activation transcriptionnelle médiée par IRF1 et co-réprime la transcription avec IRF2 alors qu'en synergie avec les facteurs de transcription de la famille

Ets (PU.1, E47...), IRF8 permet l'activation transcriptionnelle d'éléments composites Ets-IRF ou EICE (« Ets-IRF Composite Element ») (pour revue (Levi et al., 2002)).

Le facteur IRF8 comporte un domaine de fixation à l'ADN et un domaine d'association aux IRF (**Figure 45A**). La capacité de IRF8 à se fixer à l'ADN et à interagir avec des facteurs de transcription est régulée par phosphorylation. La phosphorylation d'une tyrosine du domaine DBD empêche la fixation directe d'IRF8 à l'ADN mais est essentielle aux interactions protéiques. Le facteur IRF8 se fixe à l'ADN seulement en association avec des facteurs de transcription contenant un module PEST qui interagit avec le domaine IAD (pour revue (Levi et al., 2002)).

Le facteur IRF8 est essentiel à la différenciation des cellules myéloïdes en macrophages et est impliqué dans le développement des cellules dendritiques et cellules B (pour revue (Tamura and Ozato, 2002)). IRF8 active ou réprime des gènes impliqués dans différents processus biologiques, notamment la réponse inflammatoire (gp91<sup>phox</sup>, iNOS, IL1 $\beta$ , TLR4) et la réponse immunitaire (IL12, IL18, ISG15) (pour revue (Tamura and Ozato, 2002)) (**Figure 45B**).

Le LTR du VIH-1 contient en aval du site d'initiation de la transcription un élément ISRE nécessaire à une transcription efficace du virus (Van Lint et al., 1997). Le gène *IRF8* étant fortement exprimé dans les cellules U1 infectées de façon latente et son expression étant diminuée après traitement par le NaB, ce gène pourrait être impliqué dans le maintien de la latence du VIH-1. En effet, une forte expression de IRF8 pourrait permettre de maintenir une expression virale à bas niveau dans les cellules de la lignée monocyte/macrophage.



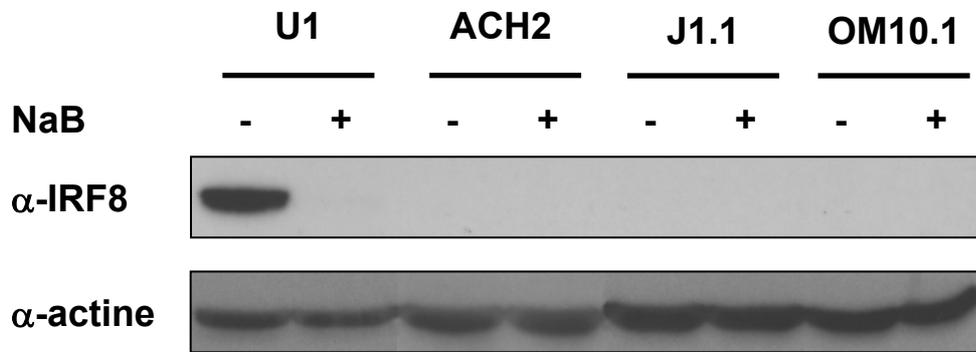
## 2.4.2. Modification de l'expression du gène *IRF8* dans les cellules U1 infectées de façon latente et stimulées par le NaB

### 2.4.2.1. Expression des ARNm *IRF8*

Le gène *IRF8* (Unigene Hs. 137427) est exprimé dans les cellules de la lignée de monocytes/macrophages U1 (intensité du signal de 707,9 avec une valeur p de 0,000244) (**Tableau 9A**) mais n'est pas exprimé dans les cellules de la lignée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ACH2 (résultat non montré). Après traitement par le NaB, l'expression du gène *IRF8* est diminuée de 16 fois (rapport des intensités d'hybridation en log<sub>2</sub> U1 NaB vs. U1 de -4 avec une valeur 1-p de 0,99998) (**Tableau 9A**).

La modification de l'expression du gène *IRF8* a été validée par des expériences de RT-PCR quantitative. Cinq traitements indépendants de cellules ont été réalisés et les ARN ont été extraits après 24 et 48 h. Une RT-PCRq *IRF8* a été réalisée à partir des ARN extraits après 24 et 48 h de traitement des cellules U1 par le NaB. La **Figure 46A** représente le taux d'inhibition de l'expression du gène *IRF8* dans les cellules U1 traitées par le NaB par rapport aux cellules non traitées. Nous observons une sous-expression de l'ARN *IRF8* dans les cellules U1 stimulées pendant 24 h par le NaB de  $14,96 \pm 4,85$  fois par rapport aux cellules non stimulées (**Figure 46A**). La sous-expression du gène *IRF8* est également observée après 48 h de traitement par le NaB des cellules U1 (sous-expression de  $22,06 \pm 11,29$  fois) (**Figure 46A**). Les résultats obtenus avec les expériences de RT-PCRq confirment ceux obtenus avec les hybridations sur micropuces. La modification d'expression transcriptionnelle du gène *IRF8* est donc validée.

Nous avons voulu déterminer si l'expression du gène *IRF8* était modifiée de la même façon après traitement des cellules parentales non infectées U937 par le NaB. Le gène *IRF8* est également sous-exprimé dans les cellules U937 traitées par le NaB (sous-expression de  $17,95 \pm 4,15$  fois après 24 h et sous-expression de  $22,32 \pm 10,82$  fois après 48 h de traitement) (**Figure 46B**).



**Figure 47. Analyse de l'expression de la protéine IRF8 par Western-Blot.**

Les extraits nucléaires (100  $\mu$ g) des cellules U1, ACH2, OM10.1 et J1.1 traitées (+) ou non (-) par le NaB pendant 24 h ont été séparés sur gel SDS-PAGE à 8% et transférés sur membrane. La protéine IRF8 est détectée à l'aide d'un anticorps  $\alpha$ -IRF8 (en haut). La quantité de protéines a été normalisée en utilisant un anticorps  $\alpha$ -actine (en bas). Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Nous avons réalisé des expériences supplémentaires afin de déterminer si les variations d'expression du gène *IRF8* pouvaient être observées après traitement des cellules U1 par le PMA et la TSA. L'expression du gène *IRF8* est diminuée après traitement par le PMA (sous-expression de  $3,22 \pm 0,45$  fois après 24 h de traitement) et la TSA (sous-expression de  $5,32 \pm 1,09$  fois après 24 h de traitement) des cellules U1 (**Figure 46C**). Cependant, la diminution de l'expression du gène *IRF8* après traitement par le PMA et la TSA est de plus faible amplitude que celle obtenue après traitement par le NaB.

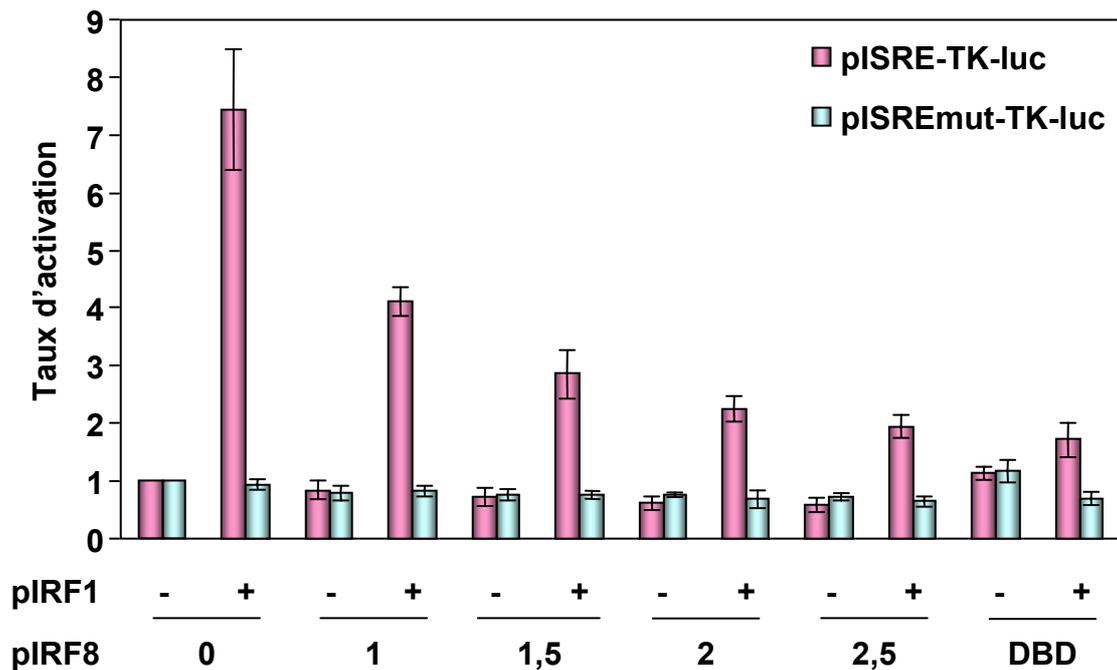
Nous avons également analysé l'expression du gène *IRF8* dans les lignées cellulaires infectées de façon latente OM10.1 et J1.1. Comme les cellules ACH2, les cellules lymphocytaires J1.1 n'expriment pas le gène *IRF8* (résultats non montrés). Au contraire des cellules U1, les cellules promonocytaires OM10.1 n'expriment pas le gène *IRF8* (résultats non montrés).

#### 2.4.2.2. Expression de la protéine *IRF8*

Afin de confirmer que les modifications observées au niveau des ARNm *IRF8* corrélaient avec l'expression de la protéine, nous avons réalisé un Western-Blot anti-*IRF8* à partir d'extraits nucléaires de cellules U1, ACH2, OM10.1 et J1.1 traitées ou non pendant 24 h par du NaB (**Figure 47**). Les résultats montrent une expression de la protéine *IRF8* uniquement dans les cellules U1 non stimulées. Le traitement par le NaB inhibe totalement l'expression de la protéine *IRF8* dans les cellules U1 (**Figure 47**). Ces résultats corrélaient avec l'expression différentielle du gène *IRF8* observée par les expériences d'hybridation sur micropuces et de RT-PCRq. L'expression de la protéine *IRF8* est donc diminuée après traitement des cellules U1 infectées de façon latente par le NaB.

#### 2.4.3. Répression transcriptionnelle de l'élément ISRE du VIH-1 par *IRF8*

Nous avons ensuite analysé le rôle fonctionnel d'*IRF8* sur la transcription du promoteur viral par des expériences de transfection. Nous avons co-transfecté des cellules HEK293 avec



**Figure 48. IRF8 inhibe l'activation transcriptionnelle *via* l'élément ISRE du VIH-1 par IRF1.**

Les cellules HEK293 ont été co-transfectées avec les plasmides pISRE-TK-luc (250 ng) ou pISREmut-TK-luc (250 ng) avec (+) ou sans (-) les vecteurs d'expression pIRF1 (250 ng), pIRF8 (1-2,5 µg) ou pIRF8-DBD (1 µg). L'index luciférase normalisé (activité luciférase / activité β-galactosidase) est mesuré après 24 h de transfection et le taux d'activation est déterminé par rapport à l'activité basale du plasmide pISRE-TK-luc correspondant. Ces résultats représentent la moyenne de cinq expériences indépendantes.

le plasmide rapporteur pISRE-TK-luc, contenant le gène *luciférase* sous le contrôle du promoteur minimum de la thymidine kinase (TK) du virus Herpes simplex en amont duquel a été cloné l'élément ISRE du VIH-1 localisé en aval du site d'initiation de la transcription (nt +194 à +223), en présence ou en absence des plasmides permettant l'expression des facteurs IRF1 et IRF8 (**Figure 48**).

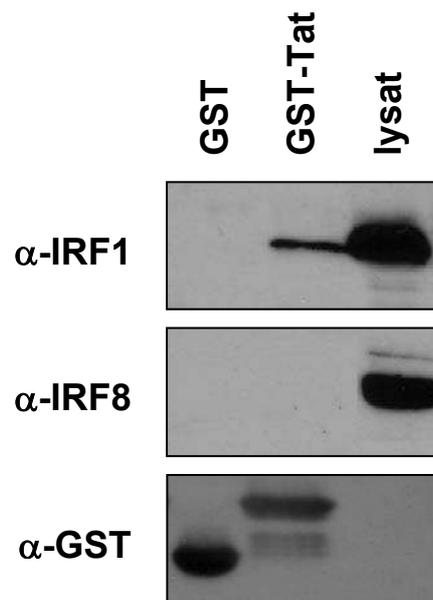
L'activité basale du promoteur ISRE-TK est augmentée de  $7,4 \pm 1,0$  fois en présence d'IRF1, comme attendu (Sgarbanti et al., 2002) (**Figure 48**). Une diminution de l'activité basale est observée en présence d'IRF8 ( $21,9 \pm 10,6$  à  $41,4 \pm 9,5$  %) (**Figure 48**). L'expression d'IRF8 inhibe de  $43,5 \pm 10,6$  à  $74,7 \pm 2,5$  % l'activation du promoteur ISRE-TK par IRF1 de manière dose dépendante (**Figure 48**). L'expression du mutant dominant négatif IRF8-DBD inhibe de  $76,4 \pm 6,5$  % l'activation du promoteur ISRE-TK par IRF1, comme attendu (Thornton et al., 1996) (**Figure 48**). Les effets inhibiteurs d'IRF8 et d'IRF8-DBD et l'effet activateur d'IRF1 sont abolis lorsque l'élément ISRE est muté (pISREmut-TK-luc) (**Figure 48**).

Ces résultats montrent qu'IRF8 inhibe l'activation de la transcription du promoteur viral par IRF1 *via* l'élément ISRE.

#### 2.4.4. Etude des interactions entre Tat, IRF1 et IRF8

Comme IRF1 active la transcription du promoteur viral *via* l'élément ISRE, nous avons recherché des interactions entre Tat, IRF1 et IRF8. Pour cela, nous avons effectué des expériences de « GST pull-down » sur des lysats totaux de cellules HEK293 transfectées avec les plasmides exprimant IRF1 et IRF8. Les extraits protéiques ont été incubés avec les protéines GST ou GST-Tat purifiées sur des billes de Glutathion et les protéines récupérées analysées par Western-Blot avec des anticorps anti-IRF1 et anti-IRF8 (**Figure 49**).

La présence des protéines de fusion GST et GST-Tat est vérifiée par hybridation avec un anticorps anti-GST (**Figure 49**,  $\alpha$ -GST). Les protéines IRF1 et IRF8 sont présentes dans les



**Figure 49. Analyse des interactions entre Tat, IRF1 et IRF8.**

Des cellules HEK293 ont été transfectées avec les plasmides pIRF1 et pIRF8 et les extraits protéiques ont été préparés 48 h p.t. (lysat). Les lysat totaux (2 mg) ont été incubés avec des protéines GST ou GST-Tat purifiées sur billes de Glutathion. Les protéines ont été révélées par Western-Blot avec des anticorps anti-IRF1, anti-IRF8 et anti-GST.

lysats totaux des cellules HEK293 transfectées. La protéine IRF1 interagit avec la protéine GST-Tat et n'interagit pas avec la protéine GST (**Figure 49**,  $\alpha$ -IRF1). La protéine IRF8 n'interagit avec aucune des deux protéines (**Figure 49**,  $\alpha$ -IRF8).

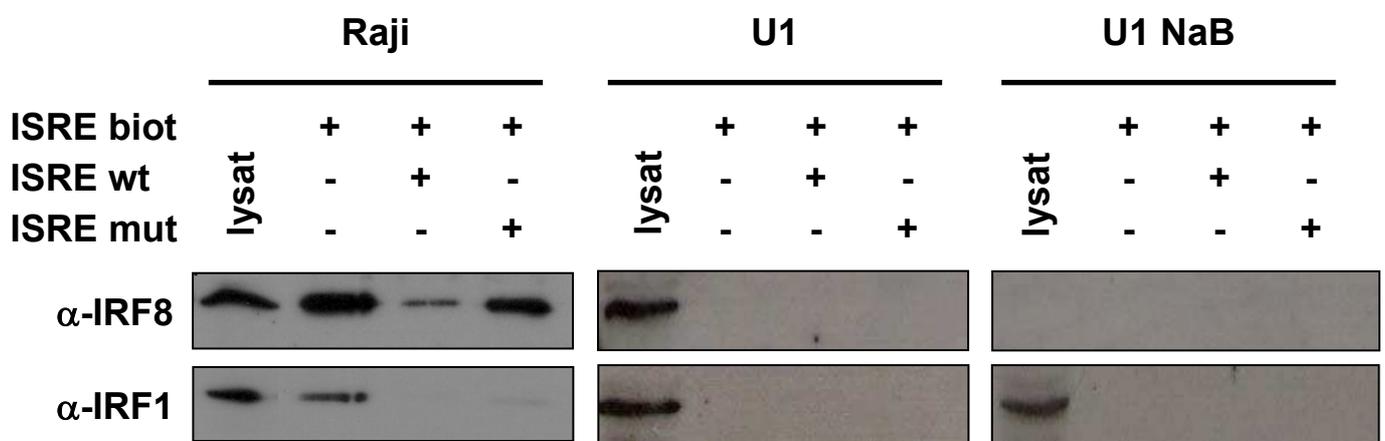
En conclusion, la protéine IRF1, mais pas IRF8, interagit avec la protéine virale Tat.

#### **2.4.5. Etude du recrutement du facteur IRF8 sur le LTR**

Au vu de l'effet répresseur d'IRF8 sur l'activation de la transcription virale par IRF1, nous avons cherché à savoir si le facteur IRF8 exerce cet effet en se liant à la séquence ISRE du LTR. Pour cela, nous avons effectué des expériences d'étude d'interaction ADN-protéine (« DNA pull-down ») sur des extraits nucléaires de cellules Raji ou de cellules U1 stimulées ou non par le NaB afin de déterminer si les facteurs IRF8 et IRF1 se lient de façon spécifique au LTR du VIH-1. Les extraits ont été incubés avec des oligonucléotides biotinylés contenant la séquence ISRE du VIH-1, couplés à des billes Streptavidine (ISRE biot) en présence ou en absence d'un excès d'oligonucléotides non biotinylés sauvages (ISRE wt) ou mutants (ISRE mut). Les complexes isolés ont été examinés par Western-Blot avec des anticorps anti-IRF8 et anti-IRF1 (**Figure 50**).

Les résultats obtenus sur des extraits de cellules Raji montrent que le facteur IRF8 se lie à l'élément ISRE du VIH-1. La spécificité de fixation est confirmée en utilisant un excès d'oligonucléotides non biotinylés sauvages ou mutants (**Figure 50**,  $\alpha$ -IRF8). De même, le facteur IRF-1 se lie à la séquence ISRE (**Figure 50**,  $\alpha$ -IRF1). En revanche, ces résultats ne sont pas reproduits sur les extraits de cellules U1 stimulées ou non par le NaB (**Figure 50**).

Ni le facteur IRF1 présent dans les extraits de cellules U1 et U1 NaB, ni le facteur IRF8 présent dans les extraits de cellules U1, ne semblent se fixer sur la séquence ISRE du VIH-1.



**Figure 50. IRF8 se lie à l'élément ISRE du LTR du VIH-1.**

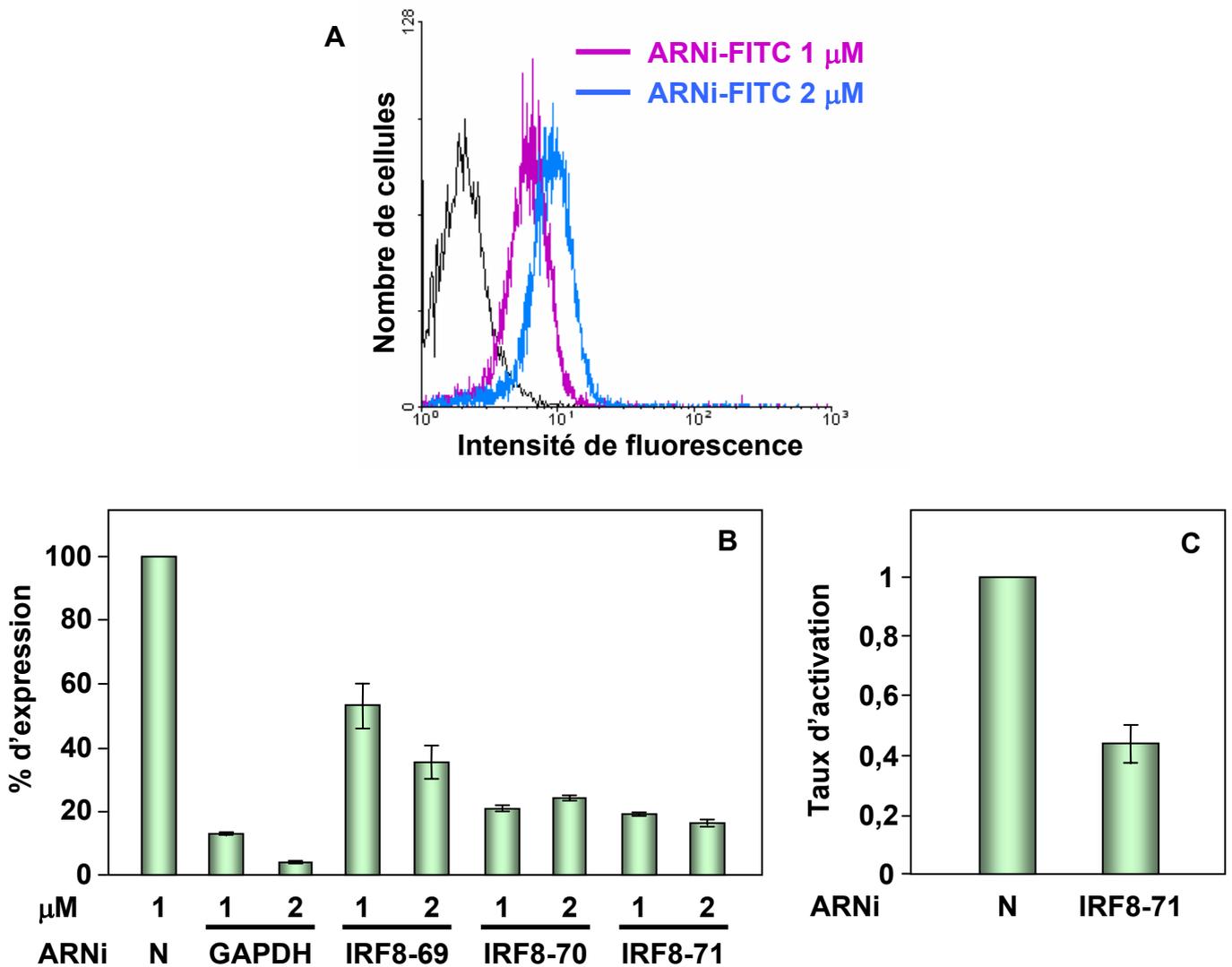
Cent  $\mu$ g d'extraits nucléaires de cellules Raji ou de cellules U1 traitées (U1 NaB) ou non (U1) par le NaB pendant 24 h (lysats) ont été incubés avec 25 pmoles d'oligonucléotides contenant la séquence ISRE du VIH-1 biotinylés couplés à des billes Streptavidine magnétiques (ISRE biot), avec (+) ou sans (-) un excès d'oligonucléotides non biotinylés sauvages (ISRE wt) ou mutés (ISRE mut). Les protéines fixées ont été analysées par Western-Blot avec des anticorps anti-IRF8 ou anti-IRF1.

#### 2.4.6. Réactivation de la latence par inhibition de l'expression d'IRF8 dans les cellules infectées ?

Enfin, nous avons analysé si l'inhibition de l'expression d'IRF8 dans les cellules U1 pouvait permettre la réactivation de la latence. Pour cela, nous avons utilisé une stratégie d'ARN interférant (ARNi).

Les cellules U1 ont été transfectées avec 3 ARNi spécifiques d'IRF8 (IRF8-69, IRF8-70 et IRF8-71) et les ARN ont été extraits 48 h p.t. L'efficacité de transfection des ARNi a été mesurée après transfection d'un ARNi fluorescent couplé au FITC (**Figure 51A**). Le pourcentage de cellules fluorescentes est de 47,9 et 86,2% après transfection de 1 et 2  $\mu\text{M}$  d'ARNi-FITC respectivement, avec une moyenne d'intensité de fluorescence passant de 2,82 à 13,8 et 22,9 respectivement. Afin de s'assurer que l'efficacité de transfection des ARNi est suffisante pour observer une inhibition de l'expression du gène cible, nous avons également transfecté un ARNi validé spécifique de la GAPDH. L'expression des gènes *GAPDH* et *IRF8* ont été quantifiées par RT-PCRq et normalisées par rapport à l'expression du gène *cyclophiline A* (**Figure 51B**). Les pourcentages d'expression sont déterminés par rapport à l'expression obtenue après transfection des cellules U1 avec un ARNi contrôle négatif (100%). On observe une diminution de l'expression des ARNm *GAPDH* de 87 à 96% après transfection de dose croissantes d'ARNi GAPDH (**Figure 51B**). Ces résultats permettent de valider les conditions expérimentales. On observe une diminution de l'expression des ARNm *IRF8* de 47 et 65% après transfection de 1 et 2  $\mu\text{M}$  d'ARNi IRF8-69, de 79 et 76% après transfection de 1 et 2  $\mu\text{M}$  d'ARNi IRF8-70, et de 81 à 84% après transfection de 1 et 2  $\mu\text{M}$  d'ARNi IRF8-71 (**Figure 51B**). Les 3 ARNi spécifiques d'IRF8 permettent d'inhiber l'expression du gène *IRF8* dans les cellules U1, avec un meilleur effet pour l'ARNi IRF8-71.

Nous avons ensuite analysé les conséquences de l'inactivation du gène *IRF8* après transfection de l'ARNi IRF8-71 à 2  $\mu\text{M}$  sur l'expression virale dans les cellules U1 par



**Figure 51. Analyse de l'expression des ARNm *gag* après invalidation de l'expression d'IRF8 dans les cellules U1.**

Les cellules U1 ont été transfectées avec différentes concentrations (1 et 2  $\mu$ M) d'ARN interférant (ARNi) fluorescents couplés au FITC (A), contrôles négatifs (N), spécifiques du gène *GAPDH* et spécifiques du gène *IRF8* (IRF8-69, IRF8-70, IRF8-71) (B et C). L'efficacité de transfection est mesurée par l'intensité de fluorescence des cellules U1 transfectées avec les ARNi-FITC (A). Les ARN ont été extraits 48 h p.t. et des RT-PCRq *GAPDH*, *IRF8*, *gag* et *cyclophiline A* ont été réalisées. Le pourcentage d'expression des gènes *GAPDH* et *IRF8* est déterminé par rapport à l'expression obtenue après transfection de l'ARNi contrôle N (B). Le taux d'activation après transfection de 2  $\mu$ M d'ARNi IRF8-71 est déterminé par rapport à l'expression des ARNm *gag/cyclophiline A* dans les cellules U1 transfectées avec l'ARNi contrôle N (C). Ces résultats représentent la moyenne de 2 RT-PCRq.

mesure des ARNm *gag* (**Figure 51C**). Nous n'observons pas d'augmentation de l'expression des ARNm *gag* après transfection des cellules U1 par l'ARNi IRF8 (**Figure 51C**). L'inactivation du gène *IRF8* ne semble donc pas suffisante pour réactiver le virus de la latence dans les cellules U1.

## 2.5. Conclusion

L'analyse du transcriptome différentiel de lignées cellulaires infectées de façon latente par le VIH-1 et stimulées ou non pour la réactivation de la latence virale par un inhibiteur d'HDAC, le NaB, nous a permis d'identifier 2 gènes cellulaires potentiellement impliqués : *NCoA3* et *IRF8*.

L'expression du gène *NCoA3* est augmentée après stimulation des cellules infectées de façon latente U1 et ACH2 par le NaB. Le facteur NCoA3 augmente la transcription du promoteur viral en présence de Tat mais n'interagit pas directement avec Tat. Le facteur NCoA3 pourrait être impliqué dans la réactivation de la latence virale mais nous n'avons pas pu observer une augmentation de l'expression des ARNm viraux en présence de NCoA3 dans les cellules infectées.

Le gène *IRF8* est très fortement exprimé dans les cellules U1 et son expression est diminuée après traitement par le NaB. Le facteur IRF8 inhibe l'activation de la transcription du promoteur viral par IRF1 *via* l'élément ISRE. Le facteur IRF1 interagit avec Tat et avec la séquence ISRE du LTR alors que le facteur IRF8 interagit avec la séquence ISRE mais pas avec Tat. Le facteur IRF8 pourrait être impliqué dans le maintien de la latence du VIH-1 dans les cellules de la lignée monocyte/macrophage. Cependant, l'extinction de l'expression du seul facteur IRF8 par ARNi dans les cellules U1 ne permet pas une augmentation de l'expression des ARNm viraux.

## **DISCUSSION**

## **DISCUSSION**

### **1. INFECTION DU TISSU ADIPEUX HUMAIN PAR LE VIH-1 : UN NOUVEAU TISSU CIBLE ?**

Il a été précédemment montré que les cellules du tissu adipeux exprimaient le récepteur CD4 et les corécepteurs CXCR4 et CCR5 et qu'elles pouvaient constituer de nouvelles cellules cibles pour le VIH-1 (Hazan et al., 2002). Cependant, l'infection de préadipocytes primaires *in vitro* est très peu efficace et s'accompagne d'une faible production virale (Hazan et al., 2002).

Le tissu adipeux étant impliqué dans le syndrome de lipodystrophie apparaissant chez les patients sous HAART (Gougeon et al., 2004), il est essentiel de déterminer si les cellules du tissu adipeux peuvent être infectées par le VIH-1. De plus, l'ampleur des réactivations virales observées lors des interruptions du traitement par HAART suggère que le VIH-1 persiste dans des réservoirs viraux encore non caractérisés (Blankson et al., 2002). Déterminer si le tissu adipeux se comporte comme un nouveau réservoir pour le virus est donc une question importante concernant la physiopathologie de l'infection par le VIH-1.

Je me suis donc intéressée à l'infection des cellules du tissu adipeux par le VIH-1. En particulier, j'ai essayé de déterminer à quel niveau le cycle de réplication du virus était bloqué lors de l'infection de ces cellules. En effet, la faible production virale obtenue lors de l'infection de préadipocytes *in vitro* par de fortes doses de virus peut être due à une faible efficacité d'infection (blocage au niveau de l'entrée virale) et/ou à une faible efficacité de réplication (blocage post-entrée à une étape pré- ou post-intégration).

## 1.1.Expression transcriptionnelle du provirus ?

Pour tester si la réplication virale était bloquée à une étape post-intégration, les préadipocytes ont été directement transfectés avec le plasmide proviral pNL4.3 $\Delta$ env-luc. La transfection dans les cellules de l'ADN proviral permet de s'affranchir des étapes précoces du cycle viral et d'analyser les étapes tardives du cycle de réplication. Le plasmide pNL4.3 $\Delta$ env-luc est issu du provirus NL4.3 dans lequel le gène *nef* est remplacé par le gène rapporteur *luciférase*. Ainsi, la mesure d'une activité luciférase est directement liée à la transcription de l'ADN proviral à partir du promoteur LTR. Enfin, la détection de la protéine de capsid p24 dans le surnageant des cellules transfectées indique la production de nouvelles particules virales.

L'expression de l'ADN proviral et du plasmide pLTR-luc en présence de la protéine Tat dans les préadipocytes suggère qu'il n'y a pas de blocage au niveau de la transcription du provirus. De plus, la production de nouvelles particules virales après transfection de l'ADN proviral suggère que les étapes post-transcriptionnelles, comme l'export des ARN, la traduction des protéines, l'assemblage et le bourgeonnement des particules virales s'effectuent correctement. Cependant, puisque l'ADN proviral ne permet pas l'expression de glycoprotéines d'enveloppe virale fonctionnelles, les particules virales produites par les préadipocytes ne sont pas infectieuses. L'obtention de particules virales infectieuses lors de l'infection par un virus complet a été précédemment montrée (Hazan et al., 2002).

Les mesures d'activité luciférase et de production de p24 dans les préadipocytes transfectés avec l'ADN proviral pNL4.3 $\Delta$ env-luc se sont révélées beaucoup plus faibles que celles obtenues dans les cellules HeLa transfectées. Ces différences peuvent être dues, au moins partiellement, aux différences d'efficacité de transfection des deux types cellulaires. En effet, l'efficacité de transfection des préadipocytes est peu élevée, probablement à cause de leur origine primaire. D'ailleurs, la transfection des cellules de la lignée adipocytaire PAZ6

par le plasmide pNL4.3 $\Delta$ env-luc, pour lesquelles la transfection est plus efficace, permet une production virale équivalente à celle obtenue dans les cellules HeLa.

Malgré la faible efficacité de transfection, ces résultats montrent que l'ADN proviral est transcrit par les préadipocytes et qu'il ne semble pas y avoir de blocage au niveau des étapes post-intégration. Le cycle de réplication semblerait être bloqué à une étape précédant la transcription du VIH-1.

## **1.2. Transcription inverse et intégration du provirus ?**

Pour exclure la possibilité que les étapes de transcription inverse et d'intégration soient inhibées, les préadipocytes et les adipocytes ont été infectés par des particules virales pseudotypées avec la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G. Le récepteur du virus VSV étant ubiquitaire, l'utilisation du virus NL4.3-VSV-G permet d'analyser la réplication virale après pénétration dans les cellules du tissu adipeux, même en absence des récepteurs du VIH-1. De plus, l'infection des préadipocytes par les virus pseudotypés est plus efficace et plus sensible que la transfection d'ADN proviral. Cependant, le virus pseudotypé avec la glycoprotéine d'enveloppe VSV-G pénètre dans la cellule après endocytose du récepteur et est libéré dans le cytoplasme après une étape de fusion pH-dépendante (Aiken, 1997). Les étapes précoces post-entrée sont donc différentes de celles du VIH-1 dont la fusion avec la membrane cellulaire est indépendante du pH.

Le virus pseudotypé VSV-G peut se répliquer dans les cellules du tissu adipeux. L'amplification du gène *gag* par PCR à partir de l'ADNg des cellules infectées montre que la transcription inverse et l'intégration ont eu lieu. L'obtention de particules virales suggère un cycle viral complet lors de l'infection des cellules du tissu adipeux par le virus pseudotypé NL4.3-VSV-G.

Ces résultats suggèrent qu'il ne semble pas y avoir de blocage au niveau des étapes post-entrée et pré-intégration du cycle viral. Le cycle de réplication pourrait donc être bloqué au niveau de l'entrée virale.

### **1.3. Blocage au niveau de l'entrée virale ?**

Pour étudier si l'entrée est l'étape limitante de la réplication du VIH-1, les préadipocytes et les adipocytes ont été infectés par des virus pseudotypés avec des glycoprotéines d'enveloppe de différents tropismes : NL4.3-LAI de tropisme X4 et NL4.3-ADA8 de tropisme R5.

L'infection de préadipocytes primaires ou de cellules PAZ6 par les virus pseudotypés NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8 ne permet d'obtenir ni une activité luciférase ni une production de p24. Des adipocytes à J5 de différenciation ont également été infectés avec ces virus puisqu'il a été montré que l'expression de CCR5 augmentait lors de la différenciation des préadipocytes en adipocytes (Hazan et al., 2002). Cependant, comme avec les préadipocytes, aucune infection productive n'est détectée. En revanche, une infection virale productive a été obtenue en infectant des cellules HeLa exprimant les récepteurs et co-récepteurs d'entrée du VIH-1 par les virus pseudotypés NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8, comme attendu. L'amplification de la séquence *gag* à partir de l'ADNg des cellules du tissu adipeux infectées par ces virus confirme les résultats puisqu'aucun produit de la transcription inverse n'est détecté.

Ces résultats confirment que l'étape limitante serait la pénétration du virus dans les cellules du tissu adipeux.

#### 1.4.Expression des récepteurs du VIH-1 ?

N'ayant pas détecté d'expression des ARNm *CD4*, *CXCR4* et *CCR5* par RT-PCR dans les cellules adipocytaires au moment de l'infection, il se peut que l'entrée du VIH-1 soit restreinte en raison d'une absence ou d'une expression insuffisante des récepteurs. Nous avons donc analysé l'expression des récepteurs permettant l'entrée du VIH-1 sur d'autres biopsies par RT-PCR et hybridation sur micropuces.

L'analyse de l'expression de *CD4*, *CXCR4* et *CCR5* par RT-PCR dans des préadipocytes et des adipocytes provenant de 7 biopsies différentes (A2492, A2562, A1832, A1222, M2562, M1211 et M1812) a montré que le profil d'expression des récepteurs varie en fonction des conditions de culture, de l'origine des tissus ainsi que du stade de différenciation, en accord avec les observations précédentes (Hazan et al., 2002). L'expression des récepteurs a ensuite été analysée par hybridation des ARN sur micropuces. Sur 4 biopsies testées, les ARNm de *CD4* et de *CCR5* n'ont jamais été détectés. Par contre, l'expression de l'ARNm de *CXCR4* a été observée sur 2 biopsies (A2492 et M2562) et varie en fonction des conditions de culture et du stade de différenciation. Les ARNm de *CD4*, *CXCR4* et *CCR5* ne sont jamais exprimés au même moment sur une même biopsie. Cependant, la sensibilité de la technique d'hybridation sur micropuces ne permet pas de détecter des ARNm exprimés par une faible proportion de cellules. Ces données suggèrent que la co-expression à haut niveau des récepteurs est un événement rare sur les cellules du tissu adipeux.

Une étude récente a montré la présence des ARNm des récepteurs du VIH-1 par RT-PCR dans des préadipocytes et des adipocytes matures isolés de tissus adipeux (Maurin et al., 2005). L'expression des ARNm de *CD4*, *CXCR4* et *CCR5* est maintenue après mise en culture et différenciation. Cependant, l'analyse de l'expression des récepteurs au niveau protéique par immunohistochimie et immunocytochimie n'a pas permis de détecter la protéine CD4 (Maurin et al., 2005).

L'absence ou la faible expression du récepteur CD4 peut expliquer le fait que l'entrée du virus ne soit pas efficace. Cependant, l'infection de certains types cellulaires par le VIH-1 peut être CD4-indépendante et se produire par endocytose (Daecke et al., 2005; Marechal et al., 2001). Etant donné que les adipocytes présentent une activité phagocytaire (Cousin et al., 1999), il n'est pas à exclure que de tels mécanismes soient impliqués dans l'infection des cellules du tissu adipeux.

### **1.5. Infection permissive si expression des récepteurs ?**

Nous avons finalement testé si l'expression des récepteurs pouvait rendre les cellules adipocytaires permissives à l'infection.

L'infection des préadipocytes et des cellules PAZ6 transfectés au préalable avec les plasmides exprimant CD4, CXCR4 et CCR5 par les virus pseudotypés NL4.3-LAI et NL4.3-ADA8 montre que l'expression des récepteurs permet de restaurer l'entrée du virus et par la suite, la réplication du VIH-1.

L'infection de préadipocytes transfectés avec les plasmides CD4 et CXCR4 par le virus adapté NDK de tropisme X4 permet également une infection virale productive. La production virale obtenue en infectant les préadipocytes avec le virus NDK est supérieure à celle obtenue avec le virus pseudotypé NL4.3-VSV-G, et ce malgré une faible efficacité de transfection des récepteurs du VIH-1. Ceci peut être expliqué par le fait que les virus pseudotypés sont moins infectieux (délétion du gène *nef*) et à cycle unique d'infection (mutation du gène *env*). En considérant la faible efficacité de transfection des préadipocytes humains primaires avec les récepteurs du VIH-1 et la production de p24 obtenue après infection par le virus NDK (145 pg/mL 72 h p.i. avec 20 ng de virus), on peut supposer qu'une faible proportion de cellules aient été infectées dans les expériences antérieures (750 pg/mL 72 h p.i. avec 200 ng de virus NDK) (Hazan et al., 2002).

Enfin, nous avons infecté des cellules PAZ6, préalablement transfectées avec les plasmides CD4, CXCR4 et CCR5, par des virus primaires. Comme les virus primaires sont moins infectieux que les virus produits en laboratoire, nous avons choisi de transfecter les récepteurs du VIH-1 dans les cellules PAZ6 car leur efficacité de transfection est bien supérieure à celle des préadipocytes primaires. La production de protéine p24 ainsi que l'expression des ARNm *gag* montrent que l'infection des cellules PAZ6 par le virus primaire BX01 est productive.

L'ensemble de ces résultats montre que l'expression des récepteurs et corécepteurs d'entrée du VIH-1 permet de restaurer l'infection des préadipocytes par des virus pseudotypés de tropismes X4 et R5, par un virus adapté de tropisme X4 et par un virus primaire. Le blocage du cycle viral au niveau de l'entrée est donc probablement dû à une faible ou une absence d'expression des récepteurs.

### **1.6. Susceptibilité des cellules du tissu adipeux à l'infection par le VIH-1 ?**

La faible proportion de cellules exprimant simultanément les récepteurs d'entrée du VIH-1 suggère que l'infection des cellules adipocytaires *in vitro* est un événement rare, qui nécessite de fortes doses de virus pour obtenir une production virale.

Une étude récente a montré que l'infection d'adipocytes différenciés *in vitro* à J15 avec 200 ng de virus LAI ou ADA8 permettait une production de p24 qui augmente jusqu'à 3 jours p.i. puis diminue jusqu'à la limite de détection après 6 jours d'infection (Maurin et al., 2005). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment lors de l'infection de préadipocytes (Hazan et al., 2002). Cependant, l'utilisation d'AZT, de MIP1- $\alpha$  (ligand naturel de CCR5) ou d'anticorps anti-CXCR4 n'empêche pas la production de p24 suggérant que le pic initial de production de p24 reflète un relargage passif des particules virales plutôt qu'une

réplication virale active (Maurin et al., 2005). Les cellules du tissu adipeux pourraient capturer les particules virales comme le font les cellules dendritiques *via* DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2000). L'analyse de l'expression de l'ARNm *DC-SIGN* à partir des données d'hybridation sur micropuces a montré que les préadipocytes et les adipocytes n'expriment pas d'ARNm *DC-SIGN*. Ces cellules pourraient capturer le virus *via* une autre molécule. Enfin, la capture des particules virales et la faible réplication virale ne sont pas exclusives. Après 15 jours d'infection, la présence des transcrits viraux *rev* et *tat* dans les adipocytes (Maurin et al., 2005), des protéines Env et Tat dans les préadipocytes (Hazan et al., 2002) et de particules virales infectieuses (Hazan et al., 2002; Maurin et al., 2005) démontrent la réelle infection de ces cellules.

Il est donc possible que les cellules du tissu adipeux soient susceptibles à l'infection par le VIH-1 dans de faibles proportions et dans certaines conditions.

### **1.7. Le tissu adipeux, un nouveau réservoir ?**

Si le tissu adipeux se comporte comme un réservoir pour le virus, il devrait être possible de détecter de l'ADN proviral dans les cellules adipocytaires de patients infectés sous HAART. Dupin et collaborateurs ont détecté de l'ADN proviral dans 2 échantillons d'adipocytes de patients infectés sur les 18 testés, avec un nombre de copies de l'ordre de 2 à 5 (Dupin et al., 2002). Le faible nombre de copies détectées dans les 2 échantillons peut résulter d'une contamination par des PBMC. Nous avons également détecté la présence d'ADN proviral dans des échantillons de patients infectés lipodystrophiques mais provenant probablement d'une contamination par des monocytes/macrophages (résultat non montré).

Cependant, il faut tenir compte du microenvironnement du tissu adipeux. Il a été montré que le microenvironnement du tissu lymphoïde pouvait rendre les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves permissives à l'infection par le VIH-1 (Eckstein et al., 2001). Le tissu adipeux sécrète une

grande variété de molécules notamment des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ . L'augmentation de la production de TNF- $\alpha$  corrèle avec la sévérité du syndrome de lipodystrophie (Vigouroux et al., 2003) et le TNF- $\alpha$  participe à la réduction de la masse adipeuse en inhibant l'adipogénèse et en induisant l'apoptose des préadipocytes et des adipocytes matures (Warne, 2003). Il a été montré que la réplication du VIH-1 dans les adipocytes matures est stimulée par le TNF- $\alpha$  (Maurin et al., 2005). La sécrétion de TNF- $\alpha$  par cet organe endocrine pourrait favoriser la réplication du VIH-1. Ainsi, le microenvironnement du tissu adipeux pourrait permettre l'infection des cellules adipocytaires par le VIH-1. En revanche, savoir si dans ces conditions les cellules adipocytaires peuvent constituer un réservoir pour le VIH-1 reste à élucider.

En conclusion, bien que les cellules adipocytaires soient infectables *in vitro*, l'infection est peu efficace et se produit rarement en raison du niveau d'expression des récepteurs d'entrée et seulement avec de fortes doses de virus. L'ensemble de ces données suggèrent fortement que le tissu adipeux n'est pas une cible privilégiée pour le VIH-1 *in vivo* et ne constitue probablement pas un nouveau réservoir pour le virus (Munier et al., 2003).

## **2. RECHERCHE DE GENES CELLULAIRES CANDIDATS IMPLIQUES DANS LE CONTROLE DE LA LATENCE DU VIH-1**

L'existence de réservoirs viraux est un obstacle majeur empêchant l'éradication de l'infection par le VIH-1 chez les patients sous traitement antirétroviral. Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement, le maintien et la réactivation de la latence du VIH-1. Nous avons ainsi entrepris d'analyser le transcriptome différentiel de lignées cellulaires infectées de façon latente par le VIH-1 et stimulées ou non pour la réactivation de la latence virale par un inhibiteur d'HDAC, le NaB. Le remodelage de

la chromatine étant impliqué dans la régulation de l'expression des gènes du VIH-1, l'expression différentielle des gènes cellulaires dans des lignées infectées de façon latente traitées par le NaB peut être corrélée au maintien et à la réactivation de la latence.

### **2.1. Analyse du transcriptome différentiel de lignées cellulaires infectées par le VIH-1 par micropuces à haute densité**

Nous avons analysé le transcriptome différentiel de deux lignées cellulaires infectées de façon latente, la lignée de monocytes/macrophages U1 et la lignée de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ACH2, traitées par le NaB afin d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans le maintien et la réactivation de la latence virale. La plupart des analyses de transcriptome différentiel ont permis d'étudier l'effet de l'expression des protéines virales ou de l'infection aiguë par le VIH-1 sur la transcription des gènes cellulaires dans des lignées cellulaires ou des cellules primaires. Nous avons utilisé des lignées cellulaires correspondant à des modèles de latence afin de diminuer les variations dues à l'hôte et d'avoir une induction de la réplication virale après traitement quasiment synchrone.

Récemment, Krishnan et collaborateurs ont analysé le transcriptome différentiel de lignées cellulaires infectées de façon latente par le VIH-1 (Krishnan and Zeichner, 2004). L'expression des gènes des cellules infectées et traitées par le PMA pour induire la réactivation virale a été comparée à celle des cellules parentales traitées dans les mêmes conditions. Cependant, les lignées cellulaires infectées de façon latente proviennent d'un clone cellulaire ayant survécu à une infection aiguë de la lignée parentale. Afin d'éviter l'identification des gènes dont l'expression différentielle pourrait résulter de l'établissement et du clonage de la lignée cellulaire infectée, nous avons choisi de comparer l'expression des gènes des lignées cellulaires infectées de façon latente traitées par le NaB à celle des cellules non traitées.

Nous avons identifié plusieurs centaines de gènes surexprimés ou sous-exprimés à la fois dans les cellules U1 et ACH2 traitées par le NaB par rapport aux cellules non traitées. Nous avons également identifié plusieurs centaines de gènes exprimés de façon différentielle spécifiquement dans les cellules promonocytaires et dans les cellules lymphocytaires, soulignant les différences entre les deux types cellulaires. Une étude récente menée sur les cellules promonocytaires U937 et les cellules T HUT78 infectées de façon aiguë par le VIH-1 a également montré des différences dans la régulation des gènes dans les deux types de lignées (Wen et al., 2005).

Les études précédentes sur l'effet global de l'infection aiguë par le VIH-1 sur la transcription des gènes cellulaires de lignée de cellules lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> ou promonocytaires (Geiss et al., 2000; Van 't Wout et al., 2003; Wen et al., 2005) ou de PBMC (Vahey et al., 2002) ont été réalisées entre 24 et 72 h p.i. à différentes multiplicités d'infection. Les gènes identifiés par ces approches et régulés de façon différentielle sont principalement impliqués dans la transduction du signal, le transport des protéines, la régulation transcriptionnelle, et la réponse immunitaire. Nous avons observé que les gènes régulés par le traitement au NaB sont impliqués dans les mêmes processus biologiques : régulation de la transcription, transduction du signal, réponse immunitaire, transport des protéines, métabolisme, apoptose et modification des ARN.

Les analyses antérieures par micropuces ont également étudié la transcription des gènes cellulaires en réponse à l'expression des protéines virales Nef (Shaheduzzaman et al., 2002; Simmons et al., 2001), Tat (De la Fuente et al., 2002; Izmailova et al., 2003), gp120 (Cicala et al., 2002), ou Vpr (Janket et al., 2004), et l'expression des gènes dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents de patients infectés virémiques et avirémiques (Chun et al., 2003). L'exploitation des données Affymetrix nous a permis d'identifier des gènes qui ont été précédemment associés à la réplication du VIH-1 ou à la latence.

Par exemple, la protéine Nef (Simmons et al., 2001) et le traitement au NaB induisent une surexpression de CDK9, la kinase du complexe P-TEFb nécessaire à la transactivation de la transcription virale par Tat (Herrmann and Rice, 1995). De plus, il a été montré que l'expression de la kinase CDK9 était augmentée lors de l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes (Ghose et al., 2001). Parmi les facteurs de transcription, c-Jun, dont l'expression est augmentée dans les cellules traitées par le NaB, est surexprimé après infection par le VIH-1 et par les protéines Nef et gp120 (Cicala et al., 2002). En revanche, le facteur de transcription c-Myc est sous-exprimé dans les cellules infectées par le VIH-1 (Van 't Wout et al., 2003) et également dans les cellules infectées et réactivées. Nous observons également une surexpression de la kinase MAPK1 et du récepteur CD69, comme cela a été montré lors d'une infection aiguë et dans des cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes de patients virémiques (Chun et al., 2003; Van 't Wout et al., 2003). Parmi les gènes surexprimés dans les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes de patients virémiques par rapport aux patients ayant une charge virale indétectable, on trouve des gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine comme les SMARC (« SWI/SNF-related, Matrix-associated, Actin-dependant Regulator of Chromatin ») et dans le transport vésiculaire des protéines comme les protéines syntaxine, copine et nexine (Chun et al., 2003), dont l'expression est également augmentée dans les cellules infectées de façon latente et traitées par le NaB. L'augmentation des gènes impliqués dans le transport des protéines et la fusion membranaire comme la syntaxine (Cicala et al., 2002) pourrait favoriser l'assemblage de nouvelles particules virales. De nombreuses études ont montré une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse aux interférons, comme IRF7, STAT et OAS1, dans des cellules dendritiques traitées par Tat (Izmailova et al., 2003), dans des PBMC de macaques infectés (Bosinger et al., 2004), dans des thymocytes de souris infectées (Miller et al., 2003) et dans des astrocytes (Kim et al., 2004) et des cellules B (Moir et al., 2004) infectés *in vitro*. La réactivation virale par le NaB induit également une

surexpression des gènes IRF7, STAT et OAS1. Parmi les gènes sous-exprimés lors de l'infection par le VIH-1, on retrouve des gènes impliqués dans la modification des ARN et dans la dégradation par le protéasome (Chun et al., 2003; Krishnan and Zeichner, 2004). La sous-expression des gènes impliqués dans la modification des ARN pourrait faciliter la production des ARN viraux non-épissés et simplement épissés et leur export vers le cytoplasme (Chun et al., 2003). Krishnan et collaborateurs ont montré une expression augmentée des gènes des sous-unités du protéasome avant induction de la réplication virale par le PMA (Krishnan and Zeichner, 2004) et nous observons une sous-expression des gènes PSMB8 et PSMB10 après traitement des cellules infectées de façon latente par le NaB. L'augmentation de ces gènes dans les cellules infectées de façon latente pourrait augmenter la dégradation des protéines ou des ARN viraux. D'ailleurs, le traitement de cellules infectées de façon latente par des inhibiteurs du protéasome induit une réactivation virale (Krishnan and Zeichner, 2004). L'identification de plusieurs gènes déjà identifiés comme étant régulés lors de l'infection par le VIH-1 valide notre approche.

L'analyse des données des micropuces pourrait également permettre d'identifier les gènes régulés de façon différentielle par le NaB. Une approche similaire a montré une diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et une surexpression des gènes suppresseurs de tumeurs (Joseph et al., 2004). Enfin, une étude de transcriptome différentiel a été réalisée sur des cellules T CD4<sup>+</sup> dont la quiescence a été induite par le facteur LKLF (« Lung Krüppel-like Factor ») (Haaland et al., 2005). Quelques gènes surexprimés lors de la quiescence de ces cellules sont sous-exprimés après traitement par le NaB (ELF4 (« E74-like Factor »), cycline D, NKG7 (« Natural Killer cell Group 7 »), EMP3 (« Epithelial Membrane Protein 3 »), Granzyme). Il serait intéressant de comparer les gènes régulés par le NaB avec ceux régulés lors de l'activation de cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes.

Nous avons choisi de poursuivre notre étude sur deux gènes candidats qui nous ont paru particulièrement intéressants et qui pourraient être impliqués dans la réactivation et le maintien de la latence : il s'agit des gènes *NCoA3* et *IRF8*.

## **2.2. Implication du gène *NCoA3* dans la réactivation de la latence du VIH-1 ?**

*NCoA3* est un coactivateur de récepteur nucléaire qui augmente l'activation transcriptionnelle des récepteurs nucléaires en permettant le remodelage de la chromatine et le recrutement des facteurs généraux de transcription. Nous avons montré que l'expression du gène *NCoA3* est augmentée après traitement des cellules U1 et ACH2 infectées de façon latente par le NaB. L'expression du gène *NCoA3* est régulée de la même façon dans deux types de lignées cellulaires : des cellules promonocytaires et des cellules lymphocytaires T CD4<sup>+</sup>. Nous avons dans un premier temps vérifié l'expression différentielle du gène *NCoA3* au niveau transcriptionnel par des expériences de RT-PCRq. La transcription du gène *NCoA3* est augmentée après traitement des cellules infectées de façon latente par le NaB et le PMA. Deux voies d'activation différentes permettent donc une surexpression du gène *NCoA3*. Cependant, un autre inhibiteur d'HDAC, la TSA, n'a pas d'effet sur l'expression du gène *NCoA3*. L'expression différentielle du gène *NCoA3* est également observée après traitement au NaB des cellules parentales non infectées et de deux autres lignées cellulaires infectées de façon latente : les cellules promonocytaires OM10.1 et les cellules lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> J1.1. Dans un deuxième temps, nous avons vérifié le niveau d'expression de la protéine *NCoA3* par Western-Blot sur des extraits nucléaires de cellules traitées ou non par le NaB. La protéine *NCoA3* est plus fortement exprimée après traitement des cellules infectées de façon latente par le NaB. Le facteur *NCoA3* est donc surexprimé lors de la réactivation de la latence virale. Une étude par micropuces réalisée sur des cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes infectées de

façon latente de patients infectés a montré une surexpression du gène *NCoA3* chez les patients virémiques comparé aux patients avirémiques (Chun et al., 2003). Le facteur NCoA3 pourrait donc être impliqué dans l'activation de l'expression du VIH-1.

Nous avons ensuite analysé le rôle fonctionnel de NCoA3 sur la transcription du promoteur viral. Nous avons montré par des expériences de transfection que le facteur NCoA3 n'a pas d'effet sur la transcription basale du promoteur viral LTR mais qu'il augmente d'environ 3 fois l'activation transcriptionnelle du LTR par la protéine virale Tat. Cet effet est dépendant de la région TAR, nécessaire à l'activité transactivatrice de Tat. L'effet de NCoA3 sur la transcription virale a été également décrit par Kino et collaborateurs. Ils ont montré que les trois membres de la famille p160/SRC, les facteurs NCoA1, NCoA2 et NCoA3 augmentent la transactivation de la transcription du LTR par Tat d'environ 3 à 5 fois selon le coactivateur et la lignée cellulaire utilisé (Kino et al., 2002). Ces coactivateurs augmentent également la transcription du promoteur LTR du MMTV en présence de dexaméthasone (Kino et al., 2002).

Nous avons ensuite cherché quels étaient les partenaires de NCoA3 sur le promoteur viral. Nous avons tout d'abord testé si les protéines NCoA3 et Tat pouvaient interagir. D'après les co-immunoprécipitations réalisées, les protéines NCoA3 et Tat ne semblent pas interagir directement. Cependant, l'interaction non spécifique de la protéine Tat-FLAG avec les anticorps négatifs rend difficile l'interprétation. La co-immunoprécipitation de la cycline T1 avec Tat valide l'expérience. Nous avons également testé si NCoA3 pouvait interagir indirectement avec Tat, notamment *via* une interaction avec la cycline T1. La encore, nous n'avons pu montrer une interaction directe entre NCoA3 et la cycline T1.

Les travaux de Kino et collaborateurs ont cependant montré une interaction directe entre les facteurs de la famille p160/SRC et Tat par des expériences de « GST pull-down » avec des protéines radiomarquées traduites *in vitro* (Kino et al., 2002). De plus, une interaction

tripartite a été montrée *in vivo* entre les protéines NCoA2, Tat et cycline T1. Les sites d'interaction entre NCoA2, Tat et cycline T1 ont été cartographiés : Tat et cycline T1 interagissent avec le domaine N-terminal de NCoA2 contenant le DBD, NCoA2 interagit avec Tat sur la région N-terminale contenant le domaine de transactivation et de fixation à la cycline T1 et NCoA2 interagit avec la cycline T1 sur la région contenant le domaine de fixation à Tat (Kino et al., 2002). Le modèle proposé par Kino et collaborateurs est que NCoA2 fonctionne comme un coactivateur de Tat sur le promoteur LTR en rapprochant les protéines fixées sur le promoteur avec le complexe P-TEFb-Tat *via* ses interactions avec Tat et cycline T1 (Kino et al., 2002).

L'activité transactivatrice de Tat pourrait être stimulée par NCoA3 par des mécanismes similaires. Il nous faut cependant vérifier les interactions entre NCoA3, Tat et la cycline T1. NCoA3 pourrait également interagir avec d'autres facteurs interagissant avec Tat, comme la kinase CDK9. L'interaction indirecte entre Tat et NCoA3 pourrait faire intervenir les HAT p300/CBP et P/CAF qui interagissent à la fois avec NCoA3 et Tat (Chen et al., 1997). Dans ce cas, NCoA3 pourrait permettre de recruter localement les HAT nécessaires à l'activation de la transcription par Tat. Il faudrait également vérifier ces interactions dans les cellules infectées de façon latente et stimulées ou non pour la réactivation virale par le NaB.

Nous allons par la suite chercher à quel niveau du promoteur interagit le facteur NCoA3 et notamment vérifier l'implication de la voie NF- $\kappa$ B dans l'activation du LTR par NCoA3. En effet, NCoA3 est un coactivateur de NF- $\kappa$ B (Werbajh et al., 2000) et son activité est régulée par le complexe I $\kappa$ B kinase (Wu et al., 2002). Le facteur NF- $\kappa$ B interagit avec le coactivateur NCoA3 et permet son recrutement sur les promoteurs contenant des sites NF- $\kappa$ B (Werbajh et al., 2000). De plus, NCoA3 interagit avec le complexe IKK qui permet l'activation de NF- $\kappa$ B et la translocation nucléaire de NCoA3 après phosphorylation (Wu et al., 2002). Enfin, les inhibiteurs d'HDAC ont un effet synergique avec NF- $\kappa$ B pour activer la transcription du LTR

(Quivy et al., 2002). Ainsi, le recrutement de NCoA3 sur le LTR *via* les sites NF- $\kappa$ B pourrait être impliqué dans l'activation du LTR dépendante de NCoA3. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait transfecter des cellules en présence de Tat et NCoA3 avec une version du promoteur LTR déléetée des sites NF- $\kappa$ B et analyser l'effet sur la transactivation de la transcription. Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Kino et collaborateurs qui ont montré le recrutement de NCoA2 sur le LTR *via* les sites NF- $\kappa$ B (Kino et al., 2002). Cependant, il semble que l'effet de la délétion des sites NF- $\kappa$ B soit partiel et que d'autres facteurs puissent contribuer au recrutement de NCoA2 sur le promoteur viral. A terme, nous envisageons d'étudier le recrutement de NCoA3 sur le LTR grâce à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine sur des cellules U1 et ACH2 stimulées par le NaB. Ces expériences permettront de déterminer si le facteur NCoA3 est recruté sur le promoteur viral spécifiquement lors de la réactivation virale et d'identifier la région du promoteur et les facteurs responsables de ce recrutement.

Il a été récemment démontré que le recrutement d'HAT sur le LTR est un évènement précoce de l'activation transcriptionnelle (Lusic et al., 2003) et qu'une des conséquences de l'acétylation des histones est le recrutement de complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants de type SWI/SNF sur le LTR (Henderson et al., 2004). NCoA3 pourrait permettre un remodelage de la chromatine en recrutant des facteurs à activité HAT (comme p300/CBP et P/CAF) et par son activité HAT intrinsèque (Chen et al., 1997) et pourrait alors contribuer à la réactivation de la latence du promoteur viral. Ainsi, nous pourrions vérifier l'implication fonctionnelle du recrutement de NCoA3 sur le LTR en mesurant l'acétylation des histones, traduisant un déverrouillage de la chromatine nécessaire à l'expression transcriptionnelle du génome viral.

Par ailleurs, l'acétylation de la protéine Tat par différents facteurs à activité HAT (p300/CBP, P/CAF et GCN5) module son affinité d'interaction avec l'ARN TAR et avec la

cycline T1 (Kiernan et al., 1999). NCoA3, qui possède une activité acétyltransférase intrinsèque (Chen et al., 1997), pourrait également acétyler la protéine virale Tat et ainsi réguler l'activation transcriptionnelle du LTR.

Finalement, nous avons voulu analyser si la surexpression de NCoA3 pouvait permettre la réactivation de la latence virale dans les cellules infectées. Nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression des ARNm *gag* après transfection du plasmide pNCoA3 seul ou en association avec pTat dans les cellules U1. En revanche, la transfection de 50 ng de plasmide pTat permet de réactiver l'expression virale. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. D'une part, les cellules U1 se transfectent difficilement et il est possible que l'efficacité de transfection ne soit pas suffisante pour observer une réactivation virale en présence de NCoA3 seul. D'autre part, les quantités de plasmide pTat transfectées sont peut être trop élevées pour observer une augmentation de la transactivation virale en présence de NCoA3. Il faudrait transfecter les cellules avec des quantités sub-optimales de Tat. De plus, la transfection des cellules par le vecteur pcDNA3.1 avec le système Amaxa réactive faiblement l'expression virale, ce qui pourrait annuler l'effet potentiel de NCoA3 sur la transcription virale. Pour s'affranchir de ce problème, il faudrait transduire ces cellules avec des vecteurs lentiviraux permettant d'exprimer NCoA3. Une autre solution serait d'inhiber l'expression de NCoA3 par ARNi puis de stimuler les cellules par le NaB et d'analyser l'expression virale.

En conclusion, l'expression du gène *NCoA3* est augmentée lors de la réactivation de la latence de lignées cellulaires infectées. Nous avons montré que NCoA3 potentialisait l'activité transactivatrice de Tat. Un modèle de régulation de l'activité transactivatrice de Tat par NCoA3 serait un recrutement au niveau du LTR *via* les éléments NF- $\kappa$ B et une interaction directe et/ou indirecte avec Tat. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de vérifier l'implication de NCoA3 dans la réactivation du promoteur viral de la latence.

### **2.3. Implication du gène *IRF8* dans l'établissement et le maintien de la latence du VIH-1 ?**

IRF8 est un facteur de transcription qui se fixe sur les éléments ISRE et régule l'expression des gènes induits par les IFN. IRF8 est capable à la fois d'activer et de réprimer la transcription des gènes en fonction du gène cible et des facteurs avec lesquels il interagit. Nous avons montré que le gène *IRF8* est uniquement exprimé dans la lignée de cellules promonocytaires U1 infectées de façon latente. Son expression est fortement diminuée après traitement des cellules U1 par le NaB. Nous avons tout d'abord vérifié l'expression différentielle du gène *IRF8* au niveau transcriptionnel par des expériences de RT-PCRq. La transcription du gène *IRF8* est diminuée après traitement des cellules infectées de façon latente par deux inhibiteurs d'HDAC, le NaB et la TSA, et par l'activateur de la voie PKC, le PMA. Plusieurs molécules permettent donc une sous-expression du gène *IRF8* dans les cellules U1. L'expression différentielle du gène *IRF8* est également observée après traitement au NaB des cellules parentales non infectées. Cependant, les lignées infectées de façon latente de cellules lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> ACH2 et J1.1 et de cellules promonocytaires OM10.1 n'expriment pas le gène *IRF8*. Ces résultats soulignent les différences entre les deux types cellulaires. De plus, il existe des changements de régulation spécifiques de certaines lignées cellulaires, comme cela a été montré dans des cellules lymphocytaires CEM et Jurkat (Van 't Wout et al., 2003). Nous avons par la suite vérifié le niveau d'expression de la protéine IRF8 par Western-Blot sur des extraits nucléaires de cellules traitées ou non par le NaB. La protéine IRF8 est uniquement exprimée dans les cellules U1 non traitées. Le facteur IRF8 est donc sous-exprimé lors de la réactivation de la latence virale par le NaB et pourrait être impliqué dans le maintien de l'expression virale à bas niveau.

Le LTR du VIH-1 contient en aval du site d'initiation de la transcription un élément ISRE nécessaire à une transcription efficace du virus (El Kharroubi and Martin, 1996; Van Lint et

al., 1997). Cet élément ISRE est un site de fixation pour les facteurs de la famille des IRF. Notamment, les facteurs IRF1 et IRF2 sont recrutés sur ce site *in vivo* (Van Lint et al., 1997). Le rôle des facteurs IRF dans l'activation du LTR a donc été examiné (pour revues (Battistini et al., 2002; Marsili et al., 2003)). Les travaux de Sgarbanti et collaborateurs ont montré qu'IRF1 active la transcription basale du LTR et augmente la transactivation par Tat de manière dose dépendante (Sgarbanti et al., 2002). Par ailleurs, l'infection aiguë par le VIH-1 induit l'expression d'IRF1 dans des lignées cellulaires T et dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires (Sgarbanti et al., 2002). De plus, IRF1 se fixe sur l'élément ISRE du LTR et interagit avec Tat (Sgarbanti et al., 2002).

Nous avons analysé le rôle fonctionnel d'IRF8 sur la transcription du promoteur viral. Pour cela, nous avons cloné l'élément ISRE sauvage ou mutant du LTR dans un plasmide rapporteur. Nous avons montré qu'IRF1 active la transcription du promoteur ISRE-TK, comme attendu (Sgarbanti et al., 2002). L'effet du facteur IRF8 a été analysé et nous avons montré qu'IRF8 réprime l'activation de l'élément ISRE médiée par IRF1. Cet effet inhibiteur est observé avec un mutant dominant négatif d'IRF8 correspondant au domaine de fixation à l'ADN mais est supprimé lorsque la séquence ISRE est mutée. Ces résultats sont confirmés par ceux de Sgarbanti et collaborateurs montrant que l'expression d'IRF8 inhibe la transactivation de la transcription du LTR par Tat et IRF1 (Sgarbanti et al., 2002).

Nous avons ensuite analysé les interactions entre Tat, IRF1 et IRF8. Nous avons montré une interaction entre IRF1 et Tat par des expériences de « GST pull-down », comme attendu (Sgarbanti et al., 2002). Nous allons cartographier les domaines d'interactions d'IRF1 sur la protéine Tat avec différentes versions de protéines de fusion GST-Tat. En accord avec les travaux de Sgarbanti et collaborateurs, la protéine IRF8 n'interagit pas directement avec la protéine Tat. Cependant, IRF8 interagit avec plusieurs facteurs de transcription dont IRF1 (Taniguchi et al., 2001). Le mécanisme d'inhibition proposé par Sgarbanti et collaborateurs

est que l'expression d'IRF8 diminue l'interaction entre IRF1 et Tat par une compétition entre IRF8 et Tat pour la fixation à IRF1 (Sgarbanti et al., 2002).

Nous avons ensuite étudié le recrutement du facteur IRF8 sur le LTR dans les cellules U1. Les expériences de « DNA pull-down » ne nous ont pas permis de conclure à une fixation d'IRF8 sur l'élément ISRE du VIH-1 dans les cellules U1. Pourtant, l'expérience réalisée avec des extraits de cellules Raji a révélé une fixation spécifique d'IRF8 et d'IRF1 sur l'élément ISRE du VIH-1. Les cellules U1 sont des cellules très riches en hydrolases qui pourraient être à l'origine d'une dégradation des facteurs IRF8 et IRF1 dans les extraits nucléaires lors de la mise en œuvre des expériences, et ce malgré la présence d'anti-protéases. Au vu des problèmes rencontrés, nous nous orientons vers la mise en œuvre d'expériences de retard sur gel. Par ailleurs, nous envisageons d'étudier le recrutement d'IRF8 sur le LTR par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine de cellules U1 stimulées ou non par le NaB.

Le facteur IRF8 est fortement exprimé dans les cellules U1 et son expression est diminuée lors de la réactivation virale. Dans des conditions basales, la fixation préférentielle d'IRF8 à l'élément ISRE pourrait expliquer le faible niveau d'expression virale. Après stimulation des cellules U1 par le NaB, la diminution de l'expression d'IRF8 libérerait l'élément ISRE, sur lequel le facteur IRF1 pourrait alors se fixer et activer la transcription. Les facteurs IRF8 et IRF1 pourraient être en compétition pour la fixation à l'élément ISRE du LTR.

Nous avons montré l'expression du facteur IRF1 dans les cellules U1 traitées par le NaB mais pas d'augmentation de la transcription du gène *IRF1* par hybridation sur micropuces des ARN extraits après 24 h de traitement. Cependant, Sgarbanti et collaborateurs ont montré que les ARNm *IRF1* sont induits précocement après l'infection par le VIH-1 (3 h p.i. puis retour à un niveau basal 24 h p.i.) et avant l'expression de Tat (Sgarbanti et al., 2002). De plus, IRF1 est présent à faible niveau dans cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes et son expression est augmentée

lors de l'activation cellulaire (Nelson et al., 1996). Enfin, il a été montré une surexpression des facteurs IRF1 et IRF2 par la protéine virale Nef (Simmons et al., 2001). De façon concomitante à la diminution de l'expression d'IRF8, la surexpression du facteur IRF1 pourrait donc permettre la réactivation de la latence. D'autres facteurs de la famille IRF, par exemple le facteur IRF7, dont l'expression est augmentée après traitement par le NaB et par l'expression de Tat (Izmailova et al., 2003), pourraient être impliqués dans la réactivation de l'expression virale.

Le rôle du facteur IRF8 dans la réplication du VIH-1 a été étudié. IRF8 bloque la réplication du VIH-1 dans des cellules lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> (Sgarbanti et al., 2002), alors qu'IRF1 l'augmente (Sgarbanti et al., 2004). D'ailleurs, l'effet inhibiteur d'IRF8 est supprimé lorsqu'IRF1 est surexprimé. IRF8 inhibe également l'infection par le VIH-1 de cellules de la lignée monocytes/macrophages (Thornton et al., 1996). Ces données renforcent l'hypothèse qu'IRF8 pourrait jouer un rôle dans le maintien de la latence virale. Des expériences d'inhibition de la réplication par IRF8 de virus pseudotypé exprimant le gène *luciférase* montrerait un blocage de la réplication virale au niveau transcriptionnel.

L'activation par IRF1 et l'inhibition par IRF8 de la transcription du VIH-1 pourrait faire intervenir des facteurs affectant la structure chromatinienne du LTR (El Kharroubi and Martin, 1996). En effet, IRF1 interagit avec les HAT p300/CBP et P/CAF (Merika et al., 1998) qui interagissent également avec la protéine virale Tat (Benkirane et al., 1998; Hottiger and Nabel, 1998; Marzio et al., 1998). L'expression de CBP augmente l'activation du LTR induite par IRF1 et CBP est recrutée sur le LTR par IRF1 en absence de Tat (Marsili et al., 2004). De plus, le traitement par la TSA augmente la transactivation du LTR en réponse à IRF1 et Tat (Marsili et al., 2004).

L'effet répresseur d'IRF8 sur la transcription du VIH-1 pourrait être médié *via* une interaction d'IRF8 avec différents facteurs cellulaires. De nouveaux partenaires interagissant

avec IRF8 ont été identifiés, notamment Tip60 (Levi et al., 2002), une HAT interagissant avec Tat, le facteur de transcription TEL qui permet le recrutement de l'histone déacétylase HDAC3 (Kuwata et al., 2002) et le facteur NF-AT (Zhu et al., 2003). Il a été montré que l'HDAC1 est recrutée sur le LTR par des facteurs de transcription répresseurs et que l'activation de l'expression du LTR provoque le déplacement de l'HDAC1 (Coull et al., 2000; He and Margolis, 2002). Le facteur IRF8 pourrait de façon similaire permettre le recrutement de l'HDAC3 en interagissant avec le facteur TEL (Kuwata et al., 2002). Enfin, IRF8 pourrait séquestrer d'autres facteurs comme Tip60 ou NFAT et ainsi empêcher l'activation de la transcription du VIH-1.

Finalement, nous avons voulu analyser si le blocage de l'expression d'IRF8 pouvait permettre la réactivation de la latence dans les cellules infectées. Nous avons transfecté des cellules U1 avec des ARNi spécifiques du gène *IRF8*. Les ARNi utilisés sont efficaces et permettent d'inhiber l'expression du gène *IRF8* à environ 80%. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression des ARNm *gag* après extinction du gène *IRF8*. Le taux d'extinction n'est peut être pas suffisant pour permettre une réactivation virale ; il faudrait alors tester des concentrations plus élevées d'ARNi. Une autre stratégie serait de transduire le gène *IRF8* dans les cellules U1 et d'analyser si la réactivation de la latence est inhibée après stimulation par le NaB. La latence étant un phénomène multi-factoriel, il est probable que le facteur IRF8 ne soit pas le seul facteur impliqué dans le maintien de la latence dans les cellules U1.

En conclusion, l'expression du gène *IRF8* est diminuée lors de la réactivation de la latence des cellules U1. Nous avons montré un effet inhibiteur d'IRF8 sur la transcription du VIH-1. Un modèle de maintien de l'expression virale à bas niveau dans les cellules de la lignée de monocytes/macrophages serait un recrutement au niveau du LTR *via* l'élément ISRE du facteur IRF8 qui interagirait avec des facteurs répresseurs ou séquestrerait des facteurs

activateurs, notamment en empêchant l'interaction entre Tat et IRF1. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de vérifier la contribution du facteur IRF8 dans le maintien de la latence virale.

## 2.4.Perspectives

Le modèle des lignées nous a permis de caractériser plusieurs gènes potentiellement impliqués *in vitro* dans le contrôle de la latence virale. Néanmoins, les lignées lymphocytaires et promonocytaires infectées de façon latente ne sont pas des cellules quiescentes comme c'est le cas dans les réservoirs *in vivo*. De plus, il a été montré que des mutations dans le gène *tat* et dans la séquence TAR étaient responsables de la latence dans les cellules U1 et ACH2 respectivement (Emiliani et al., 1998; Emiliani et al., 1996). En revanche, des défauts similaires de transcription ont été mis en évidence dans des PBMC de patients asymptomatiques (Adams et al., 1994; Peng et al., 1995). Les défauts transcriptionnels observés seraient compensés lors de l'activation cellulaire *in vitro* et pendant la virémie. De plus, le taux élevé de mutation du VIH-1 génère un grand nombre de variants de la protéine Tat qui pourraient faciliter l'établissement d'une latence post-intégrative (Reza et al., 2003). C'est pourquoi nous voudrions confirmer nos résultats sur des macrophages et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires, qui représentent respectivement un modèle physiologique de persistance et de latence virale.

Pour cela, nous appliquerons le modèle de lymphocytes T primaires quiescents infectés *in vitro* établi par Ivan Hirsch (Gondois-Rey et al., 2001) qui est le système cellulaire de latence post-intégrative le plus proche de la réalité physiologique. Dans ce système, des PBMC activées sont infectées à forte multiplicité d'infection et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents sont sélectionnés après 3 semaines de culture par immunodéplétion des cellules CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> et HLA-DR<sup>+</sup>. Des macrophages isolés à partir de PBMC seront également infectés *in*

*vitro*. Des expériences de RT-PCRq, d'analyse des interactions ADN-protéines, de transfection et d'ARN interférence, sur des cellules primaires infectées de façon latente *in vitro* stimulées ou non pour la réactivation de la latence, nous permettront de confirmer l'implication potentielle des gènes *IRF8* et *NCoA3* dans le maintien et la réactivation de la latence virale *in vivo*.

Ces données moléculaires fourniront des informations essentielles sur les mécanismes de contrôle de la latence et de la réactivation virale dans les réservoirs cellulaires inaccessibles aux traitements. Elles pourraient apporter des outils potentiels permettant d'interférer avec le cycle viral, soit en « forçant » le virus à se répliquer, le rendant sensible aux antirétroviraux, ce qui permettrait de réduire les réservoirs cellulaires chez les patients, soit en empêchant sa réactivation pour interférer avec la dissémination virale.

## **BIBLIOGRAPHIE**

**BIBLIOGRAPHIE**

- Adam, E., Quivy, V., Bex, F., Chariot, A., Collette, Y., Vanhulle, C., Schoonbroodt, S., Goffin, V., Nguyen, T.L., Gloire, G., Carrard, G., Friguet, B., De Launoit, Y., Burny, A., Bours, V., Piette, J. and Van Lint, C. (2003) Potentiation of tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation by deacetylase inhibitors is associated with a delayed cytoplasmic reappearance of I kappa B alpha. *Mol Cell Biol*, **23**, 6200-6209.
- Adams, M., Sharmeen, L., Kimpton, J., Romeo, J.M., Garcia, J.V., Peterlin, B.M., Groudine, M. and Emerman, M. (1994) Cellular latency in human immunodeficiency virus-infected individuals with high CD4 levels can be detected by the presence of promoter-proximal transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3862-3866.
- Aiken, C. (1997) Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J Virol*, **71**, 5871-5877.
- Anderson, J.L. and Hope, T.J. (2003) Recent Insights into HIV Accessory Proteins. *Curr Infect Dis Rep*, **5**, 439-450.
- Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M. and Meltzer, P.S. (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, **277**, 965-968.
- Aquaro, S., Bagnarelli, P., Guenci, T., De Luca, A., Clementi, M., Balestra, E., Calio, R. and Perno, C.F. (2002) Long-term survival and virus production in human primary macrophages infected by human immunodeficiency virus. *J Med Virol*, **68**, 479-488.
- Ashburner, B.P., Westerheide, S.D. and Baldwin, A.S., Jr. (2001) The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol*, **21**, 7065-7077.
- Bannister, A.J., Schneider, R. and Kouzarides, T. (2002) Histone methylation: dynamic or static? *Cell*, **109**, 801-806.
- Barboric, M., Nissen, R.M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N. and Peterlin, B.M. (2001) NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell*, **8**, 327-337.

- Barre-Sinoussi, F. (2003) The early years of HIV research: integrating clinical and basic research. *Nat Med*, **9**, 844-846.
- Battistini, A., Marsili, G., Sgarbanti, M., Ensoli, B. and Hiscott, J. (2002) IRF regulation of HIV-1 long terminal repeat activity. *J Interferon Cytokine Res*, **22**, 27-37.
- Benkirane, M., Chun, R.F., Xiao, H., Ogryzko, V.V., Howard, B.H., Nakatani, Y. and Jeang, K.T. (1998) Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J Biol Chem*, **273**, 24898-24905.
- Berger, E.A. (1997) HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS*, **11**, S3-S16.
- Berger, E.A., Murphy, P.M. and Farber, J.M. (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and disease. *Annual Review of Immunology*, **17**, 657-700.
- Berger, S.L. (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 142-148.
- 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.
- Biancotto, A., Grivel, J.C., Gondois-Rey, F., Bettendroffer, L., Vigne, R., Brown, S., Margolis, L.B. and Hirsch, I. (2004) Dual role of prostratin in inhibition of infection and reactivation of human immunodeficiency virus from latency in primary blood lymphocytes and lymphoid tissue. *J Virol*, **78**, 10507-10515.
- Bieniasz, P.D. (2003) Restriction factors: a defense against retroviral infection. *Trends Microbiol*, **11**, 286-291.
- Blaak, H., van't Wout, A.B., Brouwer, M., Hooibrink, B., Hovenkamp, E. and Schuitemaker, H. (2000) In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1269-1274.
- Blankson, J.N., Finzi, D., Pierson, T.C., Sabundayo, B.P., Chadwick, K., Margolick, J.B., Quinn, T.C. and Siliciano, R.F. (2000) Biphasic decay of latently infected CD4+ T cells in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*, **182**, 1636-1642.
- Blankson, J.N., Persaud, D. and Siliciano, R.F. (2002) The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med*, **53**, 557-593.

- Bohan, C., York, D. and Srinivasan, A. (1987) Sodium butyrate activates human immunodeficiency virus long terminal repeat--directed expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **148**, 899-905.
- Bohnlein, E., Lowenthal, J.W., Siekevitz, M., Ballard, D.W., Franza, B.R. and Greene, W.C. (1988) The same inducible nuclear proteins regulates mitogen activation of both the interleukin-2 receptor-alpha gene and type 1 HIV. *Cell*, **53**, 827-836.
- Bosinger, S.E., Hosiawa, K.A., Cameron, M.J., Persad, D., Ran, L., Xu, L., Boulassel, M.R., Parenteau, M., Fournier, J., Rud, E.W. and Kelvin, D.J. (2004) Gene expression profiling of host response in models of acute HIV infection. *J Immunol*, **173**, 6858-6863.
- Braaten, D., Franke, E.K. and Luban, J. (1996) Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *J Virol*, **70**, 3551-3560.
- Bres, V., Kiernan, R., Emiliani, S. and Benkirane, M. (2002a) Tat acetyl-acceptor lysines are important for human immunodeficiency virus type-1 replication. *J Biol Chem*, **277**, 22215-22221.
- Bres, V., Tagami, H., Peloponese, J.M., Loret, E., Jeang, K.T., Nakatani, Y., Emiliani, S., Benkirane, M. and Kiernan, R.E. (2002b) Differential acetylation of Tat coordinates its interaction with the co-activators cyclin T1 and PCAF. *Embo J*, **21**, 6811-6819.
- Brigati, C., Giacca, M., Noonan, D.M. and Albin, A. (2003) HIV Tat, its TARgets and the control of viral gene expression. *FEMS Microbiol Lett*, **220**, 57-65.
- Brussel, A. and Sonigo, P. (2004) Evidence for gene expression by unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA species. *J Virol*, **78**, 11263-11271.
- Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A. and Stevenson, M. (1998) Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med*, **188**, 2113-2125.
- Bukrinskaya, A.G. (2004) HIV-1 assembly and maturation. *Arch Virol*, **149**, 1067-1082.
- Bukrinsky, M.I., Haggerty, S., Dempsey, M.P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. and Stevenson, M. (1993) A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature*, **365**, 666-669.
- Bukrinsky, M.I., Sharova, N., Dempsey, M.P., Stanwick, T.L., Bukrinskaya, A.G., Haggerty, S. and Stevenson, M. (1992) Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6580-6584.

- 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.
- Bushman, F.D. (2002) Integration site selection by lentiviruses: biology and possible control. *Curr Top Microbiol Immunol*, **261**, 165-177.
- Butera, S.T., Perez, V.L., Wu, B.Y., Nabel, G.J. and Folks, T.M. (1991) Oscillation of the human immunodeficiency virus surface receptor is regulated by the state of viral activation in a CD4+ cell model of chronic infection. *J Virol*, **65**, 4645-4653.
- Carteau, S., Hoffmann, C. and Bushman, F. (1998) Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are a disfavored target. *J Virol*, **72**, 4005-4014.
- Cartier, C., Sivard, P., Tranchat, C., Decimo, D., Desgranges, C. and Boyer, V. (1999) Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *J Biol Chem*, **274**, 19434-19440.
- Cavert, W., Notermans, D.W., Staskus, K., Wietgreffe, S.W., Zupancic, M., Gebhard, K., Henry, K., Zhang, Z.Q., Mills, R., McDade, H., Schuwirth, C.M., Goudsmit, J., Danner, S.A. and Haase, A.T. (1997) Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *Science*, **276**, 960-964.
- Chazal, N. and Gerlier, D. (2003) Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 226-237, table of contents.
- Chen, H. and Engelman, A. (1998) The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15270-15274.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y. and Evans, R.M. (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*, **90**, 569-580.
- Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D. and Evans, R.M. (1999) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell*, **98**, 675-686.
- Chen, L., Fischle, W., Verdin, E. and Greene, W.C. (2001) Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science*, **293**, 1653-1657.
- Chen, L.F. and Greene, W.C. (2004) Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 392-401.

- Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E. and Debyser, Z. (2003) HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem*, **278**, 372-381.
- Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., Kuo, Y.H., Brookmeyer, R., Zeiger, M.A., Barditch-Crovo, P. and Siliciano, R.F. (1997a) Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*, **387**, 183-188.
- Chun, T.W., Chadwick, K., Margolick, J. and Siliciano, R.F. (1997b) Differential susceptibility of naive and memory CD4<sup>+</sup> T cells to the cytopathic effects of infection with human immunodeficiency virus type 1 strain LAI. *J Virol*, **71**, 4436-4444.
- Chun, T.W., Davey, R.T., Jr., Engel, D., Lane, H.C. and Fauci, A.S. (1999a) Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature*, **401**, 874-875.
- Chun, T.W., Davey, R.T., Jr., 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., 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., Engel, D., Mizell, S.B., Hallahan, C.W., Fischette, M., Park, S., Davey, R.T., Jr., Dybul, M., Kovacs, J.A., Metcalf, J.A., Mican, J.M., Berrey, M.M., Corey, L., Lane, H.C. and Fauci, A.S. (1999b) Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected, resting CD4<sup>+</sup> T cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med*, **5**, 651-655.
- Chun, T.W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D. and Siliciano, R.F. (1995) In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med*, **1**, 1284-1290.
- Chun, T.W., Justement, J.S., Lempicki, R.A., Yang, J., Dennis, G., Jr., Hallahan, C.W., Sanford, C., Pandya, P., Liu, S., McLaughlin, M., Ehler, L.A., Moir, S. and Fauci, A.S. (2003) Gene expression and viral production in latently infected, resting CD4<sup>+</sup> T cells in viremic versus aviremic HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1908-1913.
- 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. (1997c) Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir

- during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13193-13197.
- Cicala, C., Arthos, J., Selig, S.M., Dennis, G., Jr., Hosack, D.A., Van Ryk, D., Spangler, M.L., Steenbeke, T.D., Khazanie, P., Gupta, N., Yang, J., Daucher, M., Lempicki, R.A. and Fauci, A.S. (2002) HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9380-9385.
- Clapham, P.R. and McKnight, A. (2002) Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J Gen Virol*, **83**, 1809-1829.
- Clouse, K.A., Powell, D., Washington, I., Poli, G., Strebel, K., Farrar, W., Barstad, P., Kovacs, J., Fauci, A.S. and Folks, T.M. (1989) Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone. *J Immunol*, **142**, 431-438.
- 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.
- Connor, R.I., Chen, B.K., Choe, S. and Landau, N.R. (1995) Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology*, **206**, 935-944.
- 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.
- Cousin, B., Munoz, O., Andre, M., Fontanilles, A.M., Dani, C., Cousin, J.L., Laharrague, P., Casteilla, L. and Penicaud, L. (1999) A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *Faseb J*, **13**, 305-312.
- Creaven, M., Hans, F., Mutskov, V., Col, E., Caron, C., Dimitrov, S. and Khochbin, S. (1999) Control of the histone-acetyltransferase activity of Tip60 by the HIV-1 transactivator protein, Tat. *Biochemistry*, **38**, 8826-8830.
- Crowe, S., Zhu, T. and Muller, W.A. (2003) The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. *J Leukoc Biol*, **74**, 635-641.

- Cujec, T.P., Cho, H., Maldonado, E., Meyer, J., Reinberg, D. and Peterlin, B.M. (1997) The human immunodeficiency virus transactivator Tat interacts with the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell Biol*, **17**, 1817-1823.
- Cullen, B.R. (2003) Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem Sci*, **28**, 419-424.
- Daecke, J., Fackler, O.T., Dittmar, M.T. and Krausslich, H.G. (2005) Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol*, **79**, 1581-1594.
- Davey, R.T., Jr., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T.W., Metcalf, J.A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R.A., Adelsberger, J.W., Miller, K.D., Kovacs, J.A., Polis, M.A., Walker, R.E., Falloon, J., Masur, H., Gee, D., Baseler, M., Dimitrov, D.S., Fauci, A.S. and Lane, H.C. (1999) HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15109-15114.
- De la Fuente, C., Santiago, F., Deng, L., Eadie, C., Zilberman, I., Kehn, K., Maddukuri, A., Baylor, S., Wu, K., Lee, C.G., Pumfery, A. and Kashanchi, F. (2002) Gene expression profile of HIV-1 Tat expressing cells: a close interplay between proliferative and differentiation signals. *BMC Biochem*, **3**, 14.
- Demarchi, F., d'Adda di Fagagna, F., Falaschi, A. and Giacca, M. (1996) Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **70**, 4427-4437.
- Demirov, D.G. and Freed, E.O. (2004) Retrovirus budding. *Virus Res*, **106**, 87-102.
- Demirov, D.G., Orenstein, J.M. and Freed, E.O. (2002) The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell type-dependent manner. *J Virol*, **76**, 105-117.
- Demonte, D., Quivy, V., Colette, Y. and Van Lint, C. (2004) Administration of HDAC inhibitors to reactivate HIV-1 expression in latent cellular reservoirs: implications for the development of therapeutic strategies. *Biochem Pharmacol*, **68**, 1231-1238.
- Deng, L., de la Fuente, C., Fu, P., Wang, L., Donnelly, R., Wade, J.D., Lambert, P., Li, H., Lee, C.G. and Kashanchi, F. (2000) Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones. *Virology*, **277**, 278-295.
- Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M., Skinner, M.A. and Valerio, R. (1989) Human immunodeficiency virus 1 tat

- protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 6925-6929.
- Doetzlhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., Wintersberger, E. and Seiser, C. (1999) Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol*, **19**, 5504-5511.
- Dornadula, G., Zhang, H., VanUitert, B., Stern, J., Livornese, L., Jr., Ingberman, M.J., Witek, J., Kedanis, R.J., Natkin, J., DeSimone, J. and Pomerantz, R.J. (1999) Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *Jama*, **282**, 1627-1632.
- Dorr, A., Kiermer, V., Pedal, A., Rackwitz, H.R., Henklein, P., Schubert, U., Zhou, M.M., Verdin, E. and Ott, M. (2002) Transcriptional synergy between Tat and PCAF is dependent on the binding of acetylated Tat to the PCAF bromodomain. *Embo J*, **21**, 2715-2723.
- Dragic, T. and Alizon, M. (1993) Different requirements for membrane fusion mediated by the envelopes of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J Virol*, **67**, 2355-2359.
- Duh, E.J., Maury, W.J., Folks, T.M., Fauci, A.S. and Rabson, A.B. (1989) Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 5974-5978.
- Dumonceaux, J., Nisole, S., Chanel, C., Quivet, L., Amara, A., Baleux, F., Briand, P. and Hazan, U. (1998) Spontaneous mutations in the env gene of the human immunodeficiency virus type 1 NDK isolate are associated with a CD4-independent entry phenotype. *J Virol*, **72**, 512-519.
- Dupin, N., Buffet, M., Marcelin, A.G., Lamotte, C., Gorin, I., Ait-Arkoub, Z., Treluyer, J.M., Bui, P., Calvez, V. and Peytavin, G. (2002) HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy. *Aids*, **16**, 2419-2424.
- Dvorin, J.D., Bell, P., Maul, G.G., Yamashita, M., Emerman, M. and Malim, M.H. (2002) Reassessment of the roles of integrase and the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol*, **76**, 12087-12096.
- Dvorin, J.D. and Malim, M.H. (2003) Intracellular trafficking of HIV-1 cores: journey to the center of the cell. *Curr Top Microbiol Immunol*, **281**, 179-208.

- Eberharter, A. and Becker, P.B. (2002) Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep*, **3**, 224-229.
- Eckert, D.M. and Kim, P.S. (2001) Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*, **70**, 777-810.
- Eckstein, D.A., Penn, M.L., Korin, Y.D., Scripture-Adams, D.D., Zack, J.A., Kreisberg, J.F., Roederer, M., Sherman, M.P., Chin, P.S. and Goldsmith, M.A. (2001) HIV-1 actively replicates in naive CD4(+) T cells residing within human lymphoid tissues. *Immunity*, **15**, 671-682.
- El Kharroubi, A. and Martin, M.A. (1996) cis-acting sequences located downstream of the human immunodeficiency virus type 1 promoter affect its chromatin structure and transcriptional activity. *Mol Cell Biol*, **16**, 2958-2966.
- El Kharroubi, A., Piras, G., Zensen, R. and Martin, M.A. (1998) Transcriptional activation of the integrated chromatin-associated human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol*, **18**, 2535-2544.
- El Kharroubi, A. and Verdin, E. (1994) Protein-DNA interactions within DNase I-hypersensitive sites located downstream of the HIV-1 promoter. *J Biol Chem*, **269**, 19916-19924.
- Emiliani, S., Fischle, W., Ott, M., Van Lint, C., Amella, C.A. and Verdin, E. (1998) Mutations in the tat gene are responsible for human immunodeficiency virus type 1 postintegration latency in the U1 cell line. *J Virol*, **72**, 1666-1670.
- Emiliani, S., Van Lint, C., Fischle, W., Paras, P., Jr., Ott, M., Brady, J. and Verdin, E. (1996) A point mutation in the HIV-1 Tat responsive element is associated with postintegration latency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6377-6381.
- Farnet, C.M. and Bushman, F.D. (1997) HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell*, **88**, 483-492.
- Fassati, A. and Goff, S.P. (2001) Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **75**, 3626-3635.
- Fauci, A.S. (2003) HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat Med*, **9**, 839-843.
- Feng, S. and Holland, E.C. (1988) HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature*, **334**, 165-167.
- Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J.D., Margolick, J.B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisziewicz, J., Lori, F., Flexner, C., Quinn, T.C., Chaisson, R.E., Rosenberg, E., Walker, B., Gange, S., Gallant, J. and Siliciano, R.F. (1999) Latent infection of

- CD4(+) T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*, **5**, 512-517.
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., Gallant, J., Markowitz, M., Ho, D.D., Richman, D.D. and Siliciano, R.F. (1997) Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*, **278**, 1295-1300.
- Fischle, W., Wang, Y. and Allis, C.D. (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 172-183.
- Flamand, L., Crowley, R.W., Lusso, P., Colombini-Hatch, S., Margolis, D.M. and Gallo, R.C. (1998) Activation of CD8+ T lymphocytes through the T cell receptor turns on CD4 gene expression: implications for HIV pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3111-3116.
- Folks, T.M., Clouse, K.A., Justement, J., Rabson, A., Duh, E., Kehrl, J.H. and Fauci, A.S. (1989) Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2365-2368.
- Folks, T.M., Justement, J., Kinter, A., Dinarello, C.A. and Fauci, A.S. (1987) Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line. *Science*, **238**, 800-802.
- Folks, T.M., Justement, J., Kinter, A., Schnittman, S., Orenstein, J., Poli, G. and Fauci, A.S. (1988) Characterization of a promonocyte clone chronically infected with HIV and inducible by 13-phorbol-12-myristate acetate. *J Immunol*, **140**, 1117-1122.
- Fortin, J.F., Barat, C., Beausejour, Y., Barbeau, B. and Tremblay, M.J. (2004) Hyper-responsiveness to stimulation of human immunodeficiency virus-infected CD4+ T cells requires Nef and Tat virus gene products and results from higher NFAT, NF-kappaB, and AP-1 induction. *J Biol Chem*, **279**, 39520-39531.
- Franke, E.K., Yuan, H.E. and Luban, J. (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*, **372**, 359-362.
- Fredericksen, B.L., Wei, B.L., Yao, J., Luo, T. and Garcia, J.V. (2002) Inhibition of endosomal/lysosomal degradation increases the infectivity of human immunodeficiency virus. *J Virol*, **76**, 11440-11446.
- Freed, E.O. (2001) HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet*, **26**, 13-33.
- Freed, E.O. (2004) HIV-1 and the host cell: an intimate association. *Trends Microbiol*, **12**, 170-177.

- Furia, B., Deng, L., Wu, K., Baylor, S., Kehn, K., Li, H., Donnelly, R., Coleman, T. and Kashanchi, F. (2002) Enhancement of nuclear factor-kappa B acetylation by coactivator p300 and HIV-1 Tat proteins. *J Biol Chem*, **277**, 4973-4980.
- Furtado, M.R., Callaway, D.S., Phair, J.P., Kunstman, K.J., Stanton, J.L., Macken, C.A., Perelson, A.S. and Wolinsky, S.M. (1999) Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med*, **340**, 1614-1622.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D. and Trono, D. (1997) HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9825-9830.
- Ganesh, L., Burstein, E., Guha-Niyogi, A., Louder, M.K., Mascola, J.R., Klomp, L.W., 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.
- Gao, W.Y., Cara, A., Gallo, R.C. and Lori, F. (1993) Low levels of deoxynucleotides in peripheral blood lymphocytes: a strategy to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8925-8928.
- Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszka, D.G. and Sundquist, W.I. (2001) Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, **107**, 55-65.
- 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., Figdor, C.G. and van Kooyk, Y. (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, **100**, 587-597.
- Geiss, G.K., Bumgarner, R.E., An, M.C., Agy, M.B., van 't Wout, A.B., Hammersmark, E., Carter, V.S., Upchurch, D., Mullins, J.I. and Katze, M.G. (2000) Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology*, **266**, 8-16.
- Gerhardt, C.C., Romero, I.A., Canello, R., Camoin, L. and Strosberg, A.D. (2001) Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*, **175**, 81-92.
- Ghose, R., Liou, L.Y., Herrmann, C.H. and Rice, A.P. (2001) Induction of TAK (cyclin T1/P-TEFb) in purified resting CD4(+) T lymphocytes by combination of cytokines. *J Virol*, **75**, 11336-11343.

- Giacca, M. (2004) The HIV-1 Tat protein: a multifaceted target for novel therapeutic opportunities. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, **4**, 277-285.
- Gold, M.O., Yang, X., Herrmann, C.H. and Rice, A.P. (1998) PITALRE, the catalytic subunit of TAK, is required for human immunodeficiency virus Tat transactivation in vivo. *J Virol*, **72**, 4448-4453.
- Gondois-Rey, F., Biancotto, A., Pion, M., Chenine, A.L., Gluschankof, P., Horejsi, V., Tamalet, C., Vigne, R. and Hirsch, I. (2001) Production of HIV-1 by resting memory T lymphocytes. *Aids*, **15**, 1931-1940.
- Gougeon, M.L., Penicaud, L., Fromenty, B., Leclercq, P., Viard, J.P. and Capeau, J. (2004) Adipocytes targets and actors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy and metabolic alterations. *Antivir Ther*, **9**, 161-177.
- Greene, W.C. and Peterlin, B.M. (2002) Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med*, **8**, 673-680.
- Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Sousa, A.E., Victorino, R.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.
- Guermah, M., Malik, S. and Roeder, R.G. (1998) Involvement of TFIID and USA components in transcriptional activation of the human immunodeficiency virus promoter by NF-kappaB and Sp1. *Mol Cell Biol*, **18**, 3234-3244.
- Gunthard, H.F., Frost, S.D., Leigh-Brown, A.J., Ignacio, C.C., Kee, K., Perelson, A.S., Spina, C.A., Havlir, D.V., Hezareh, M., Looney, D.J., Richman, D.D. and Wong, J.K. (1999) Evolution of envelope sequences of human immunodeficiency virus type 1 in cellular reservoirs in the setting of potent antiviral therapy. *J Virol*, **73**, 9404-9412.
- Haaland, R.E., Yu, W. and Rice, A.P. (2005) Identification of LKLF-regulated genes in quiescent CD4(+) T lymphocytes. *Mol Immunol*, **42**, 627-641.
- Hamer, D.H. (2004) Can HIV be Cured? Mechanisms of HIV persistence and strategies to combat it. *Curr HIV Res*, **2**, 99-111.
- 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.
- Hayden, M.S. and Ghosh, S. (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*, **18**, 2195-2224.
- Hazan, U., Romero, I.A., Canello, R., Valente, S., Perrin, V., Mariot, V., Dumonceaux, J., Gerhardt, C.C., Strosberg, A.D., Couraud, P.O. and Pietri-Rouxel, F. (2002) Human

- adipose cells express CD4, CXCR4, and CCR5 receptors: a new target cell type for the immunodeficiency virus-1? *Faseb J*, **16**, 1254-1256.
- Hazan, U., Thomas, D., Alcamì, J., Bachelier, F., Israël, N., Yssel, H., Virelizier, J.-L. and Arenzana-Seisdedos, F. (1990) Stimulation of human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kappa B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 7861-7865.
- He, G. and Margolis, D.M. (2002) Counterregulation of chromatin deacetylation and histone deacetylase occupancy at the integrated promoter of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the HIV-1 repressor YY1 and HIV-1 activator Tat. *Mol Cell Biol*, **22**, 2965-2973.
- He, G., Ylisastigui, L. and Margolis, D.M. (2002) The regulation of HIV-1 gene expression: the emerging role of chromatin. *DNA Cell Biol*, **21**, 697-705.
- Henderson, A., Holloway, A., Reeves, R. and Tremethick, D.J. (2004) Recruitment of SWI/SNF to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol*, **24**, 389-397.
- Henderson, A.J. and Calame, K.L. (1997) CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) sites are required for HIV-1 replication in primary macrophages but not CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 8714-8719.
- Herbein, G., Coaquette, A., Perez-Bercoff, D. and Pancino, G. (2002) Macrophage activation and HIV infection: can the Trojan horse turn into a fortress? *Curr Mol Med*, **2**, 723-738.
- Hermankova, M., Siliciano, J.D., Zhou, Y., Monie, D., Chadwick, K., Margolick, J.B., Quinn, T.C. and Siliciano, R.F. (2003) Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression in Latently Infected Resting CD4(+) T Lymphocytes In Vivo. *J Virol*, **77**, 7383-7392.
- Herrmann, C.H., Carroll, R.G., Wei, P., Jones, K.A. and Rice, A.P. (1998) Tat-associated kinase, TAK, activity is regulated by distinct mechanisms in peripheral blood lymphocytes and promonocytic cell lines. *J Virol*, **72**, 9881-9888.
- Herrmann, C.H. and Rice, A.P. (1995) Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *J Virol*, **69**, 1612-1620.

- Hindmarsh, P., Ridky, T., Reeves, R., Andrake, M., Skalka, A.M. and Leis, J. (1999) HMG protein family members stimulate human immunodeficiency virus type 1 and avian sarcoma virus concerted DNA integration in vitro. *J Virol*, **73**, 2994-3003.
- Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M. and Markowitz, M. (1995) Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, **373**, 123-126.
- Ho, D.D., Rota, T.R. and Hirsch, M.S. (1986) Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. *J Clin Invest*, **77**, 1712-1715.
- Hottiger, M.O. and Nabel, G.J. (1998) Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat with the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein. *J Virol*, **72**, 8252-8256.
- Israel, N., Hazan, U., Alcamí, J., Munier, A., Arenzana-Seisdedos, F., Bachelier, F., Israel, A. and Virelizier, J.L. (1989) Tumor necrosis factor stimulates transcription of HIV-1 in human T lymphocytes, independently and synergistically with mitogens. *J Immunol*, **143**, 3956-3960.
- Izmailova, E., Bertley, F.M., Huang, Q., Makori, N., Miller, C.J., Young, R.A. and Aldovini, A. (2003) HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nat Med*, **9**, 191-197.
- Janket, M.L., Manickam, P., Majumder, B., Thotala, D., Wagner, M., Schafer, E.A., Collman, R.G., Srinivasan, A. and Ayyavoo, V. (2004) Differential regulation of host cellular genes by HIV-1 viral protein R (Vpr): cDNA microarray analysis using isogenic virus. *Biochem Biophys Res Commun*, **314**, 1126-1132.
- Jeang, K.T., Chun, R., Lin, N.H., Gatlignol, A., Glabe, C.G. and Fan, H. (1993) In vitro and in vivo binding of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and Sp1 transcription factor. *J Virol*, **67**, 6224-6233.
- Johnstone, R.W. (2002) Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 287-299.
- Joliot, V., Goujon, C., Dumonceaux, J., Renard, A., Briand, P. and Hazan, U. (2001) A human immunodeficiency virus Env inducible transcription system to examine consequences of gp120 expression. *J Virol Methods*, **98**, 145-151.
- Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Luciw, P.A. and Tjian, R. (1986) Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science*, **232**, 755-759.
- 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, 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.
- Joseph, J., Mudduluru, G., Antony, S., Vashistha, S., Ajitkumar, P. and Somasundaram, K. (2004) Expression profiling of sodium butyrate (NaB)-treated cells: identification of regulation of genes related to cytokine signaling and cancer metastasis by NaB. *Oncogene*, **23**, 6304-6315.
- Kaehlcke, K., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Kiermer, V., Henklein, P., Schnoelzer, M., Loret, E., Cole, P.A., Verdin, E. and Ott, M. (2003) Acetylation of Tat defines a cyclinT1-independent step in HIV transactivation. *Mol Cell*, **12**, 167-176.
- Kalpana, G.V., Marmon, S., Wang, W., Crabtree, G.R. and Goff, S.P. (1994) Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science*, **266**, 2002-2006.
- Kao, S.Y., Calman, A.F., Luciw, P.A. and Peterlin, B.M. (1987) Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature*, **330**, 489-493.
- Kato-Maeda, M., Gao, Q. and Small, P.M. (2001) Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. *Cell Microbiol*, **3**, 713-719.
- Kershaw, E.E. and Flier, J.S. (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 2548-2556.
- Kieffer, T.L., Kwon, P., Nettles, R.E., Han, Y., Ray, S.C. and Siliciano, R.F. (2005) G $\rightarrow$ A hypermutation in protease and reverse transcriptase regions of human immunodeficiency virus type 1 residing in resting CD4 $^{+}$  T cells in vivo. *J Virol*, **79**, 1975-1980.
- Kiernan, R., Bres, V., Ng, R.W., Coudart, M.P., El Messaoudi, S., Sardet, C., Jin, D.Y., Emiliani, S. and Benkirane, M. (2003) Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J Biol Chem*, **278**, 2758-2766.
- Kiernan, R.E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K.T., Benkirane, M. and Van Lint, C. (1999) HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *Embo J*, **18**, 6106-6118.
- Kim, S.Y., Li, J., Bentsman, G., Brooks, A.I. and Volsky, D.J. (2004) Microarray analysis of changes in cellular gene expression induced by productive infection of primary human astrocytes: implications for HAD. *J Neuroimmunol*, **157**, 17-26.

- Kino, T., Slobodskaya, O., Pavlakis, G.N. and Chrousos, G.P. (2002) Nuclear receptor coactivator p160 proteins enhance the HIV-1 long terminal repeat promoter by bridging promoter-bound factors and the Tat-P-TEFb complex. *J Biol Chem*, **277**, 2396-2405.
- Kinoshita, S., Su, L., Amano, M., Timmerman, L.A., Kaneshima, H. and Nolan, G.P. (1997) The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity*, **6**, 235-244.
- Kinter, A., Moorthy, A., Jackson, R. and Fauci, A.S. (2003) Productive HIV infection of resting CD4+ T cells: role of lymphoid tissue microenvironment and effect of immunomodulating agents. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **19**, 847-856.
- Kitchen, S.G., Jones, N.R., LaForge, S., Whitmire, J.K., Vu, B.A., Galic, Z., Brooks, D.G., Brown, S.J., Kitchen, C.M. and Zack, J.A. (2004) CD4 on CD8(+) T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8727-8732.
- Kitchen, S.G., Korin, Y.D., Roth, M.D., Landay, A. and Zack, J.A. (1998) Costimulation of naive CD8(+) lymphocytes induces CD4 expression and allows human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, **72**, 9054-9060.
- Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guétard, D., Hercend, T., Gluckman, J.-C. and Montagnier, L. (1984) T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, **312**, 767-768.
- Krishnan, V. and Zeichner, S.L. (2004) Host cell gene expression during human immunodeficiency virus type 1 latency and reactivation and effects of targeting genes that are differentially expressed in viral latency. *J Virol*, **78**, 9458-9473.
- Kulkosky, J., Culnan, D.M., Roman, J., Dornadula, G., Schnell, M., Boyd, M.R. and Pomerantz, R.J. (2001) Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood*, **98**, 3006-3015.
- Kuwata, T., Gongora, C., Kanno, Y., Sakaguchi, K., Tamura, T., Kanno, T., Basrur, V., Martinez, R., Appella, E., Golub, T. and Ozato, K. (2002) Gamma interferon triggers interaction between ICSBP (IRF-8) and TEL, recruiting the histone deacetylase HDAC3 to the interferon-responsive element. *Mol Cell Biol*, **22**, 7439-7448.
- Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A. and Littman, D.R. (2002) DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*, **16**, 135-144.

- Lambotte, O., Chaix, M.L., Gubler, B., Nasreddine, N., Wallon, C., Goujard, C., Rouzioux, C., Taoufik, Y. and Delfraissy, J.F. (2004) The lymphocyte HIV reservoir in patients on long-term HAART is a memory of virus evolution. *Aids*, **18**, 1147-1158.
- Lassen, K., Han, Y., Zhou, Y., Siliciano, J. and Siliciano, R.F. (2004a) The multifactorial nature of HIV-1 latency. *Trends Mol Med*, **10**, 525-531.
- Lassen, K.G., Bailey, J.R. and Siliciano, R.F. (2004b) Analysis of human immunodeficiency virus type 1 transcriptional elongation in resting CD4+ T cells in vivo. *J Virol*, **78**, 9105-9114.
- Laughlin, M.A., Zeichner, S., Kolson, D., Alwine, J.C., Seshamma, T., Pomerantz, R.J. and Gonzalez-Scarano, F. (1993) Sodium butyrate treatment of cells latently infected with HIV-1 results in the expression of unspliced viral RNA. *Virology*, **196**, 496-505.
- Lee, M.S. and Craigie, R. (1998) A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1528-1533.
- Leo, C. and Chen, J.D. (2000) The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene*, **245**, 1-11.
- Levi, B.Z., Hashmueli, S., Gleit-Kielmanowicz, M., Azriel, A. and Meraro, D. (2002) ICSBP/IRF-8 transactivation: a tale of protein-protein interaction. *J Interferon Cytokine Res*, **22**, 153-160.
- Levy, J.A. (1993) Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev*, **57**, 183-289.
- Lewinski, M.K., Bisgrove, D., Shinn, P., Chen, H., Hoffmann, C., Hannenhalli, S., Verdin, E., Berry, C.C., Ecker, J.R. and Bushman, F.D. (2005) Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription. *J Virol*, **79**, 6610-6619.
- Li, X., Liang, C., Quan, Y., Chandok, R., Laughrea, M., Parniak, M.A., Kleiman, L. and Wainberg, M.A. (1997) Identification of sequences downstream of the primer binding site that are important for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **71**, 6003-6010.
- Liang, C., Li, X., Quan, Y., Laughrea, M., Kleiman, L., Hiscott, J. and Wainberg, M.A. (1997) Sequence elements downstream of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat are required for efficient viral gene transcription. *J Mol Biol*, **272**, 167-177.

- Liao, L., Kuang, S.Q., Yuan, Y., Gonzalez, S.M., O'Malley, B.W. and Xu, J. (2002) Molecular structure and biological function of the cancer-amplified nuclear receptor coactivator SRC-3/AIB1. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **83**, 3-14.
- Lin, C.W. and Engelman, A. (2003) The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *J Virol*, **77**, 5030-5036.
- Lin, X., Irwin, D., Kanazawa, S., Huang, L., Romeo, J., Yen, T.S. and Peterlin, B.M. (2003) Transcriptional profiles of latent human immunodeficiency virus in infected individuals: effects of Tat on the host and reservoir. *J Virol*, **77**, 8227-8236.
- Lindwasser, O.W. and Resh, M.D. (2001) Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol*, **75**, 7913-7924.
- Lisziewicz, J. and Lori, F. (2002) Structured treatment interruptions in HIV/AIDS therapy. *Microbes Infect*, **4**, 207-214.
- Liu, H., Wu, X., Newman, M., Shaw, G.M., Hahn, B.H. and Kappes, J.C. (1995) The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. *J Virol*, **69**, 7630-7638.
- Llano, M., Delgado, S., Vanegas, M. and Poeschla, E.M. (2004a) Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase. *J Biol Chem*, **279**, 55570-55577.
- Llano, M., Vanegas, M., Fregoso, O., Saenz, D., Chung, S., Peretz, M. and Poeschla, E.M. (2004b) LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *J Virol*, **78**, 9524-9537.
- Lusic, M., Marcello, A., Cereseto, A. and Giacca, M. (2003) Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *Embo J*, **22**, 6550-6561.
- MacDougald, O.A. and Mandrup, S. (2002) Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol Metab*, **13**, 5-11.
- Maertens, G., Cherepanov, P., Debyser, Z., Engelborghs, Y. and Engelman, A. (2004) Identification and characterization of a functional nuclear localization signal in the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75. *J Biol Chem*, **279**, 33421-33429.

- Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debyser, Z. and Engelborghs, Y. (2003) LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem*, **278**, 33528-33539.
- Majello, B., Napolitano, G. and Lania, L. (1998) Recruitment of the TATA-binding protein to the HIV-1 promoter is a limiting step for Tat transactivation. *Aids*, **12**, 1957-1964.
- Mancebo, H.S., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D. and Flores, O. (1997) P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev*, **11**, 2633-2644.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L. and Trono, D. (2003) Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*, **424**, 99-103.
- Mansharamani, M., Graham, D.R., Monie, D., Lee, K.K., Hildreth, J.E., Siliciano, R.F. and Wilson, K.L. (2003) Barrier-to-autointegration factor BAF binds p55 Gag and matrix and is a host component of human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol*, **77**, 13084-13092.
- Marcello, A., Zoppe, M. and Giacca, M. (2001) Multiple modes of transcriptional regulation by the HIV-1 Tat transactivator. *IUBMB Life*, **51**, 175-181.
- Marechal, V., Clavel, F., Heard, J.M. and Schwartz, O. (1998) Cytosolic Gag p24 as an index of productive entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **72**, 2208-2212.
- Marechal, V., Prevost, M.C., Petit, C., Perret, E., Heard, J.M. and Schwartz, O. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol*, **75**, 11166-11177.
- Margolis, D.M., Somasundaran, M. and Green, M.R. (1994) Human transcription factor YY1 represses human immunodeficiency virus type 1 transcription and virion production. *J Virol*, **68**, 905-910.
- Mariani, R., Chen, D., Schrofelbauer, B., Navarro, F., Konig, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H. and Landau, N.R. (2003) Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell*, **114**, 21-31.
- Marin, M., Rose, K.M., Kozak, S.L. and Kabat, D. (2003) HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med*, **9**, 1398-1403.
- Markowitz, M., Louie, M., Hurley, A., Sun, E., Di Mascio, M., Perelson, A.S. and Ho, D.D. (2003) A novel antiviral intervention results in more accurate assessment of human immunodeficiency virus type 1 replication dynamics and T-cell decay in vivo. *J Virol*, **77**, 5037-5038.

- Marks, P., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T. and Kelly, W.K. (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*, **1**, 194-202.
- Marsili, G., Borsetti, A., Sgarbanti, M., Remoli, A.L., Ridolfi, B., Stellacci, E., Ensoli, B. and Battistini, A. (2003) On the role of interferon regulatory factors in HIV-1 replication. *Ann N Y Acad Sci*, **1010**, 29-42.
- Marsili, G., Remoli, A.L., Sgarbanti, M. and Battistini, A. (2004) Role of acetylases and deacetylase inhibitors in IRF-1-mediated HIV-1 long terminal repeat transcription. *Ann N Y Acad Sci*, **1030**, 636-643.
- Marzio, G., Tyagi, M., Gutierrez, M.I. and Giacca, M. (1998) HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13519-13524.
- Maurin, T., Saillan-Barreau, C., Cousin, B., Casteilla, L., Doglio, A. and Penicaud, L. (2005) Tumor necrosis factor-alpha stimulates HIV-1 production in primary culture of human adipocytes. *Exp Cell Res*, **304**, 544-551.
- McKenna, N.J. and O'Malley, B.W. (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, **108**, 465-474.
- Mellors, J.W., Griffith, B.P., Ortiz, M.A., Landry, M.L. and Ryan, J.L. (1991) Tumor necrosis factor-alpha/cachectin enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages. *J Infect Dis*, **163**, 78-82.
- Merika, M., Williams, A.J., Chen, G., Collins, T. and Thanos, D. (1998) Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol Cell*, **1**, 277-287.
- Miller, E.D., Smith, J.A., Lichtinger, M., Wang, L. and Su, L. (2003) Activation of the signal transducer and activator of transcription 1 signaling pathway in thymocytes from HIV-1-infected human thymus. *Aids*, **17**, 1269-1277.
- Miller, M.D., Farnet, C.M. and Bushman, F.D. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*, **71**, 5382-5390.
- Mitchell, R.S., Beitzel, B.F., Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C.C., Ecker, J.R. and Bushman, F.D. (2004) Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol*, **2**, E234.
- Moir, S., Lapointe, R., Malaspina, A., Ostrowski, M., Cole, C.E., Chun, T.W., Adelsberger, J., Baseler, M., Hwu, P. and Fauci, A.S. (1999) CD40-Mediated induction of CD4 and CXCR4 on B lymphocytes correlates with restricted susceptibility to human

- immunodeficiency virus type 1 infection: potential role of B lymphocytes as a viral reservoir. *J Virol*, **73**, 7972-7980.
- Moir, S., Malaspina, A., Li, Y., Chun, T.W., Lowe, T., Adelsberger, J., Baseler, M., Ehler, L.A., Liu, S., Davey, R.T., Jr., Mican, J.A. and Fauci, A.S. (2000) B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *J Exp Med*, **192**, 637-646.
- Moir, S., Malaspina, A., Pickeral, O.K., Donoghue, E.T., Vasquez, J., Miller, N.J., Krishnan, S.R., Planta, M.A., Turney, J.F., Justement, J.S., Kottlilil, S., Dybul, M., Mican, J.M., Kovacs, C., Chun, T.W., Birse, C.E. and Fauci, A.S. (2004) Decreased survival of B cells of HIV-viremic patients mediated by altered expression of receptors of the TNF superfamily. *J Exp Med*, **200**, 587-599.
- Moog, C., Kuntz-Simon, G., Caussin-Schwemling, C. and Obert, G. (1996) Sodium valproate, an anticonvulsant drug, stimulates human immunodeficiency virus type 1 replication independently of glutathione levels. *J Gen Virol*, **77 ( Pt 9)**, 1993-1999.
- Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Farooq, A., Carlson, J.E., Ott, M., Verdin, E. and Zhou, M.M. (2002) Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol Cell*, **9**, 575-586.
- Muller, B., Tessmer, U., Schubert, U. and Krausslich, H.G. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. *J Virol*, **74**, 9727-9731.
- Munier, S., Borjabad, A., Lemaire, M., Mariot, V. and Hazan, U. (2003) In vitro infection of human primary adipose cells with HIV-1: a reassessment. *Aids*, **17**, 2537-2539.
- Na, S.Y., Lee, S.K., Han, S.J., Choi, H.S., Im, S.Y. and Lee, J.W. (1998) Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. *J Biol Chem*, **273**, 10831-10834.
- Nabel, G. and Baltimore, D. (1987) An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature*, **326**, 711-713.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y. and Kingston, R.E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, **108**, 475-487.
- Navarro, F. and Landau, N.R. (2004) Recent insights into HIV-1 Vif. *Curr Opin Immunol*, **16**, 477-482.
- Nelson, N., Kanno, Y., Hong, C., Contursi, C., Fujita, T., Fowlkes, B.J., O'Connell, E., Hu-Li, J., Paul, W.E., Jankovic, D., Sher, A.F., Coligan, J.E., Thornton, A., Appella, E., Yang, Y. and Ozato, K. (1996) Expression of IFN regulatory factor family proteins in

- lymphocytes. Induction of Stat-1 and IFN consensus sequence binding protein expression by T cell activation. *J Immunol*, **156**, 3711-3720.
- Nobile, C., Petit, C., Moris, A., Skrabal, K., Abastado, J.P., Mammano, F. and Schwartz, O. (2005) Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J Virol*, **79**, 5386-5399.
- Ohagen, A. and Gabuzda, D. (2000) Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol*, **74**, 11055-11066.
- Ono, A. and Freed, E.O. (2001) Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13925-13930.
- Otero, M., Nunnari, G., Leto, D., Sullivan, J., Wang, F.X., Frank, I., Xu, Y., Patel, C., Dornadula, G., Kulkosky, J. and Pomerantz, R.J. (2003) Peripheral blood Dendritic cells are not a major reservoir for HIV type 1 in infected individuals on virally suppressive HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **19**, 1097-1103.
- Ott, M., Schnolzer, M., Garnica, J., Fischle, W., Emiliani, S., Rackwitz, H.R. and Verdin, E. (1999) Acetylation of the HIV-1 Tat protein by p300 is important for its transcriptional activity. *Curr Biol*, **9**, 1489-1492.
- Paranjape, S.M., Kamakaka, R.T. and Kadonaga, J.T. (1994) Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem*, **63**, 265-297.
- Peng, H., Reinhart, T.A., Retzel, E.F., Staskus, K.A., Zupancic, M. and Haase, A.T. (1995) Single cell transcript analysis of human immunodeficiency virus gene expression in the transition from latent to productive infection. *Virology*, **206**, 16-27.
- Percherancier, Y., Lagane, B., Planchenault, T., Staropoli, I., Altmeyer, R., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Hoessli, D.C. and Bachelier, F. (2003) HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains. *J Biol Chem*, **278**, 3153-3161.
- Pereira, L.A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M.J. and Deacon, N.J. (2000) A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res*, **28**, 663-668.
- 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.

- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M. and Ho, D.D. (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, **271**, 1582-1586.
- Perez, V.L., Rowe, T., Justement, J.S., Butera, S.T., June, C.H. and Folks, T.M. (1991) An HIV-1-infected T cell clone defective in IL-2 production and Ca<sup>2+</sup> mobilization after CD3 stimulation. *J Immunol*, **147**, 3145-3148.
- Persaud, D., Zhou, Y., Siliciano, J.M. and Siliciano, R.F. (2003) Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers. *J Virol*, **77**, 1659-1665.
- Pessler, F. and Cron, R.Q. (2004) Reciprocal regulation of the nuclear factor of activated T cells and HIV-1. *Genes Immun*, **5**, 158-167.
- Peterlin, B.M. and Trono, D. (2003) Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol*, **3**, 97-107.
- Pierson, T., Hoffman, T.L., Blankson, J., Finzi, D., Chadwick, K., Margolick, J.B., Buck, C., Siliciano, J.D., Doms, R.W. and Siliciano, R.F. (2000a) Characterization of chemokine receptor utilization of viruses in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **74**, 7824-7833.
- Pierson, T., McArthur, J. and Siliciano, R.F. (2000b) Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol*, **18**, 665-708.
- Pierson, T.C., Zhou, Y., Kieffer, T.L., Ruff, C.T., Buck, C. and Siliciano, R.F. (2002) Molecular characterization of preintegration latency in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, **76**, 8518-8531.
- Piller, S.C., Caly, L. and Jans, D.A. (2003) Nuclear import of the pre-integration complex (PIC): the Achilles heel of HIV? *Curr Drug Targets*, **4**, 409-429.
- Platanias, L.C. (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol*, **5**, 375-386.
- Pomerantz, R.J. and Horn, D.L. (2003) Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat Med*, **9**, 867-873.
- Pomerantz, R.J., Seshamma, T. and Trono, D. (1992) Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: potential implications for latency. *J Virol*, **66**, 1809-1813.
- Pomerantz, R.J., Trono, D., Feinberg, M.B. and Baltimore, D. (1990) Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency. *Cell*, **61**, 1271-1276.

- Popik, W. and Alce, T.M. (2004) CD4 receptor localized to non-raft membrane microdomains supports HIV-1 entry. Identification of a novel raft localization marker in CD4. *J Biol Chem*, **279**, 704-712.
- Popik, W., Alce, T.M. and Au, W.C. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol*, **76**, 4709-4722.
- Popov, S., Chenine, A.L., Gruber, A., Li, P.L. and Ruprecht, R.M. (2005) Long-term productive human immunodeficiency virus infection of CD1a-sorted myeloid dendritic cells. *J Virol*, **79**, 602-608.
- Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.A., Ratner, L., Lane, C.M., Moore, M.S., Blobel, G. and Bukrinsky, M. (1998) Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J*, **17**, 909-917.
- Pumfery, A., Deng, L., Maddukuri, A., de la Fuente, C., Li, H., Wade, J.D., Lambert, P., Kumar, A. and Kashanchi, F. (2003) Chromatin remodeling and modification during HIV-1 Tat-activated transcription. *Curr HIV Res*, **1**, 343-362.
- Quivy, V., Adam, E., Collette, Y., Demonte, D., Chariot, A., Vanhulle, C., Berkhout, B., Castellano, R., de Launoit, Y., Burny, A., Piette, J., Bours, V. and Van Lint, C. (2002) Synergistic activation of human immunodeficiency virus type 1 promoter activity by NF-kappaB and inhibitors of deacetylases: potential perspectives for the development of therapeutic strategies. *J Virol*, **76**, 11091-11103.
- Quivy, V. and Van Lint, C. (2002) Diversity of acetylation targets and roles in transcriptional regulation: the human immunodeficiency virus type 1 promoter as a model system. *Biochem Pharmacol*, **64**, 925-934.
- Quivy, V. and Van Lint, C. (2004) Regulation at multiple levels of NF-kappaB-mediated transactivation by protein acetylation. *Biochem Pharmacol*, **68**, 1221-1229.
- Rabbi, M.F., Al-Harhi, L. and Roebuck, K.A. (1997a) TNFalpha cooperates with the protein kinase A pathway to synergistically increase HIV-1 LTR transcription via downstream TRE-like cAMP response elements. *Virology*, **237**, 422-429.
- Rabbi, M.F., Saifuddin, M., Gu, D.S., Kagnoff, M.F. and Roebuck, K.A. (1997b) U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat contains TRE-like cAMP-responsive elements that bind both AP-1 and CREB/ATF proteins. *Virology*, **233**, 235-245.
- Ramratnam, B., Mittler, J.E., Zhang, L., Boden, D., Hurley, A., Fang, F., Macken, C.A., Perelson, A.S., Markowitz, M. and Ho, D.D. (2000) The decay of the latent reservoir

- of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med*, **6**, 82-85.
- Ramratnam, B., Ribeiro, R., He, T., Chung, C., Simon, V., Vanderhoeven, J., Hurley, A., Zhang, L., Perelson, A.S., Ho, D.D. and Markowitz, M. (2004) Intensification of antiretroviral therapy accelerates the decay of the HIV-1 latent reservoir and decreases, but does not eliminate, ongoing virus replication. *J Acquir Immune Defic Syndr*, **35**, 33-37.
- Rana, T.M. and Jeang, K.T. (1999) Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys*, **365**, 175-185.
- Reza, S.M., Rosetti, M., Mathews, M.B. and Pe'ery, T. (2003) Differential activation of Tat variants in mitogen-stimulated cells: implications for HIV-1 postintegration latency. *Virology*, **310**, 141-156.
- Roberts, C.W. and Orkin, S.H. (2004) The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer*, **4**, 133-142.
- Roebuck, K.A., Gu, D.S. and Kagnoff, M.F. (1996) Activating protein-1 cooperates with phorbol ester activation signals to increase HIV-1 expression. *Aids*, **10**, 819-826.
- Roebuck, K.A. and Saifuddin, M. (1999) Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr*, **8**, 67-84.
- Rohr, O., Marban, C., Aunis, D. and Schaeffer, E. (2003) Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells. *J Leukoc Biol*, **74**, 736-749.
- Romerio, F., Gabriel, M.N. and Margolis, D.M. (1997) Repression of human immunodeficiency virus type 1 through the novel cooperation of human factors YY1 and LSF. *J Virol*, **71**, 9375-9382.
- Rose, K.M., Marin, M., Kozak, S.L. and Kabat, D. (2004) The viral infectivity factor (Vif) of HIV-1 unveiled. *Trends Mol Med*, **10**, 291-297.
- Roth, S.Y., Denu, J.M. and Allis, C.D. (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*, **70**, 81-120.
- Ruff, C.T., Ray, S.C., Kwon, P., Zinn, R., Pendleton, A., Hutton, N., Ashworth, R., Gange, S., Quinn, T.C., Siliciano, R.F. and Persaud, D. (2002) Persistence of wild-type virus and lack of temporal structure in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in pediatric patients with extensive antiretroviral exposure. *J Virol*, **76**, 9481-9492.

- Schaeffer, E., Geleziunas, R. and Greene, W.C. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions. *J Virol*, **75**, 2993-3000.
- Schaeffer, E., Soros, V.B. and Greene, W.C. (2004) Compensatory link between fusion and endocytosis of human immunodeficiency virus type 1 in human CD4 T lymphocytes. *J Virol*, **78**, 1375-1383.
- Schroder, A.R., 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., Marechal, V., Friguet, B., Arenzana-Seisdedos, F. and Heard, J.M. (1998) Antiviral activity of the proteasome on incoming human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **72**, 3845-3850.
- Sgarbanti, M., Borsetti, A., Moscufo, N., Bellocchi, M.C., Ridolfi, B., Nappi, F., Marsili, G., Marziali, G., Coccia, E.M., Ensoli, B. and Battistini, A. (2002) Modulation of human immunodeficiency virus 1 replication by interferon regulatory factors. *J Exp Med*, **195**, 1359-1370.
- Sgarbanti, M., Marsili, G., Remoli, A.L., Ridolfi, B., Stellacci, E., Borsetti, A., Ensoli, B. and Battistini, A. (2004) Analysis of the signal transduction pathway leading to human immunodeficiency virus-1-induced interferon regulatory factor-1 upregulation. *Ann N Y Acad Sci*, **1030**, 187-195.
- Shaheduzzaman, S., Krishnan, V., Petrovic, A., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., Venkatesan, S. and Zeichner, S. (2002) Effects of HIV-1 Nef on cellular gene expression profiles. *J Biomed Sci*, **9**, 82-96.
- Sharkey, M., Triques, K., Kuritzkes, D.R. and Stevenson, M. (2005) In vivo evidence for instability of episomal human immunodeficiency virus type 1 cDNA. *J Virol*, **79**, 5203-5210.
- Sharkey, M.E., Teo, I., Greenough, T., Sharova, N., Luzuriaga, K., Sullivan, J.L., Bucy, R.P., Kostrikis, L.G., Haase, A., Veryard, C., Davaro, R.E., Cheeseman, S.H., Daly, J.S., Bova, C., Ellison, R.T., 3rd, Mady, B., Lai, K.K., Moyle, G., Nelson, M., Gazzard, B., Shaunak, S. and Stevenson, M. (2000) Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med*, **6**, 76-81.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D. and Malim, M.H. (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, **418**, 646-650.

- Sheppard, K.A., Rose, D.W., Haque, Z.K., Kurokawa, R., McInerney, E., Westin, S., Thanos, D., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K. and Collins, T. (1999) Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol*, **19**, 6367-6378.
- Sheridan, P.L., Mayall, T.P., Verdin, E. and Jones, K.A. (1997) Histone acetyltransferases regulate HIV-1 enhancer activity in vitro. *Genes Dev*, **11**, 3327-3340.
- Sherman, M.P. and Greene, W.C. (2002) Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect*, **4**, 67-73.
- Siliciano, J.D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J.B., Kovacs, C., Gange, S.J. and Siliciano, R.F. (2003) Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4(+) T cells. *Nat Med*.
- Siliciano, J.D. and Siliciano, R.F. (2004) A long-term latent reservoir for HIV-1: discovery and clinical implications. *J Antimicrob Chemother*, **54**, 6-9.
- Simmons, A., Aluvihare, V. and McMichael, A. (2001) Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity*, **14**, 763-777.
- Simon, V. and Ho, D.D. (2003) HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. *Nat Rev Microbiol*, **1**, 181-190.
- 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. and Burton, G.F. (2001) Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J Immunol*, **166**, 690-696.
- Sonza, S., Mutimer, H.P., Oelrichs, R., Jardine, D., Harvey, K., Dunne, A., Purcell, D.F., Birch, C. and Crowe, S.M. (2001) Monocytes harbour replication-competent, non-latent HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Aids*, **15**, 17-22.
- Steger, D.J., Eberharter, A., John, S., Grant, P.A. and Workman, J.L. (1998) Purified histone acetyltransferase complexes stimulate HIV-1 transcription from preassembled nucleosomal arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12924-12929.
- Stein, B.S., Gowda, S.D., Lifson, J.D., Penhallow, R.C., Bensch, K.G. and Engleman, E.G. (1987) pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via envelope fusion to the plasma membrane. *Cell*, **49**, 659-668.
- Stevens, S.W. and Griffith, J.D. (1994) Human immunodeficiency virus type 1 may preferentially integrate into chromatin occupied by L1Hs repetitive elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5557-5561.

- 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.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. and Gottlinger, H.G. (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, **114**, 689-699.
- Strain, M.C., Gunthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Smith, D.M., Leigh-Brown, A.J., Macaranas, T.R., Lam, R.Y., Daly, O.A., Fischer, M., Opravil, M., Levine, H., Bachelier, L., Spina, C.A., Richman, D.D. and Wong, J.K. (2003) Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: intrinsic stability predicts lifelong persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4819-4824.
- Strebel, K. (2003) Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *Aids*, **17 Suppl 4**, S25-34.
- Sune, C. and Garcia-Blanco, M.A. (1995) Sp1 transcription factor is required for in vitro basal and Tat-activated transcription from the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol*, **69**, 6572-6576.
- Suzuki, T., Kimura, A., Nagai, R. and Horikoshi, M. (2000) Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes Cells*, **5**, 29-41.
- Swiggard, W.J., O'Doherty, U., McGain, D., Jeyakumar, D. and Malim, M.H. (2004) Long HIV type 1 reverse transcripts can accumulate stably within resting CD4<sup>+</sup> T cells while short ones are degraded. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **20**, 285-295.
- Swingler, S., Brichacek, B., Jacque, J.M., Ulich, C., Zhou, J. and Stevenson, M. (2003) HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. *Nature*, **424**, 213-219.
- Taganov, K.D., Cuesta, I., Daniel, R., Cirillo, L.A., Katz, R.A., Zaret, K.S. and Skalka, A.M. (2004) Integrase-specific enhancement and suppression of retroviral DNA integration by compacted chromatin structure in vitro. *J Virol*, **78**, 5848-5855.
- Tamura, T. and Ozato, K. (2002) ICSBP/IRF-8: its regulatory roles in the development of myeloid cells. *J Interferon Cytokine Res*, **22**, 145-152.
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. and Tanaka, N. (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*, **19**, 623-655.
- Thornton, A.M., Buller, R.M., DeVico, A.L., Wang, I.M. and Ozato, K. (1996) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 and vaccinia virus infection by a dominant

- negative factor of the interferon regulatory factor family expressed in monocytic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 383-387.
- Tong-Starksen, S.E., Luciw, P.A. and Peterlin, B.M. (1987) Human immunodeficiency virus long terminal repeat responds to T-cell activation signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6845-6849.
- Towers, G.J., Hatzioannou, T., Cowan, S., Goff, S.P., Luban, J. and Bieniasz, P.D. (2003) Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat Med*, **9**, 1138-1143.
- Triques, K. and Stevenson, M. (2004) Characterization of restrictions to human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes. *J Virol*, **78**, 5523-5527.
- Trkola, A. (2004) HIV-host interactions: vital to the virus and key to its inhibition. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 555-559.
- Unutmaz, D., KewalRamani, V.N., Marmon, S. and Littman, D.R. (1999) Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J Exp Med*, **189**, 1735-1746.
- Vahey, M.T., Nau, M.E., Jagodzinski, L.L., Yalley-Ogunro, J., Taubman, M., Michael, N.L. and Lewis, M.G. (2002) Impact of viral infection on the gene expression profiles of proliferating normal human peripheral blood mononuclear cells infected with HIV type 1 RF. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **18**, 179-192.
- Valentin, A. and Pavlakis, G.N. (2003) Natural killer cells are persistently infected and resistant to direct killing by HIV-1. *Anticancer Res*, **23**, 2071-2075.
- Valentin, A., Rosati, M., Patenaude, D.J., Hatzakis, A., Kostrikis, L.G., Lazanas, M., Wyvill, K.M., Yarchoan, R. and Pavlakis, G.N. (2002) Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7015-7020.
- Van Furth, R. (1989) Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr Top Pathol*, **79**, 125-150.
- Van Lint, C. (2000) Role of chromatin in HIV-1 transcriptional regulation. *Adv Pharmacol*, **48**, 121-160.
- Van Lint, C., Amella, C.A., Emiliani, S., John, M., Jie, T. and Verdin, E. (1997) Transcription factor binding sites downstream of the human immunodeficiency virus type 1 transcription start site are important for virus infectivity. *J Virol*, **71**, 6113-6127.

- Van Lint, C., Emiliani, S., Ott, M. and Verdin, E. (1996a) Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *Embo J*, **15**, 1112-1120.
- Van Lint, C., Emiliani, S. and Verdin, E. (1996b) The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr*, **5**, 245-253.
- Van Lint, C., Ghysdael, J., Paras, P., Jr., Burny, A. and Verdin, E. (1994) A transcriptional regulatory element is associated with a nuclease-hypersensitive site in the pol gene of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **68**, 2632-2648.
- Van 't Wout, A.B., Lehrman, G.K., Mikheeva, S.A., O'Keeffe, G.C., Katze, M.G., Bumgarner, R.E., Geiss, G.K. and Mullins, J.I. (2003) Cellular gene expression upon human immunodeficiency virus type 1 infection of CD4(+)-T-cell lines. *J Virol*, **77**, 1392-1402.
- Vanegas, M., Llano, M., Delgado, S., Thompson, D., Peretz, M. and Poeschla, E. (2005) Identification of the LEDGF/p75 HIV-1 integrase-interaction domain and NLS reveals NLS-independent chromatin tethering. *J Cell Sci*, **118**, 1733-1743.
- Verdin, E. (1991) DNase I-hypersensitive sites are associated with both long terminal repeats and with the intragenic enhancer of integrated human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **65**, 6790-6799.
- Verdin, E., Paras, P., Jr. and Van Lint, C. (1993) Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *Embo J*, **12**, 3249-3259.
- Vignali, M., Hassan, A.H., Neely, K.E. and Workman, J.L. (2000) ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol*, **20**, 1899-1910.
- Vigouroux, C., Maachi, M., Nguyen, T.H., Coussieu, C., Gharakhanian, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Shimomura, I., Rozenbaum, W., Capeau, J. and Bastard, J.P. (2003) Serum adipocytokines are related to lipodystrophy and metabolic disorders in HIV-infected men under antiretroviral therapy. *Aids*, **17**, 1503-1511.
- Wang, F.X., Xu, Y., Sullivan, J., Souder, E., Argyris, E.G., Acheampong, E.A., Fisher, J., Sierra, M., Thomson, M.M., Najera, R., Frank, I., Kulkosky, J., Pomerantz, R.J. and Nunnari, G. (2005) IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART. *J Clin Invest*, **115**, 128-137.

- Warne, J.P. (2003) Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass. *J Endocrinol*, **177**, 351-355.
- Weber, J. (2001) The pathogenesis of HIV-1 infection. *Br Med Bull*, **58**, 61-72.
- Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H. and Jones, K.A. (1998) A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, **92**, 451-462.
- Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Johnson, V.A., Emini, E.A., Deutsch, P., Lifson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., Hahn, B.H. and et al. (1995) Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, **373**, 117-122.
- Weissman, J.D., Brown, J.A., Howcroft, T.K., Hwang, J., Chawla, A., Roche, P.A., Schiltz, L., Nakatani, Y. and Singer, D.S. (1998) HIV-1 tat binds TAFII250 and represses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11601-11606.
- Wen, W., Chen, S., Cao, Y., Zhu, Y. and Yamamoto, Y. (2005) HIV-1 infection initiates changes in the expression of a wide array of genes in U937 promonocytes and HUT78 T cells. *Virus Res*.
- Werbajh, S., Nojek, I., Lanz, R. and Costas, M.A. (2000) RAC-3 is a NF-kappa B coactivator. *FEBS Lett*, **485**, 195-199.
- Williams, S.A. and Greene, W.C. (2005) Host factors regulating post-integration latency of HIV. *Trends Microbiol*, **13**, 137-139.
- Wong, J.K., Hezareh, M., Gunthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Spina, C.A. and Richman, D.D. (1997) Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*, **278**, 1291-1295.
- Wu, R.C., Qin, J., Hashimoto, Y., Wong, J., Xu, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2002) Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase. *Mol Cell Biol*, **22**, 3549-3561.
- Wu, R.C., Qin, J., Yi, P., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (2004) Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell*, **15**, 937-949.
- Wu, X. and Burgess, S.M. (2004) Integration target site selection for retroviruses and transposable elements. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 2588-2596.
- Xiao, H., Hasegawa, T. and Isobe, K. (2000) p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21(waf1/cip1) promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor. *J Biol Chem*, **275**, 1371-1376.

- Xu, J. and Li, Q. (2003) Review of the in vivo Functions of the p160 Steroid Receptor Coactivator Family. *Mol Endocrinol*, **12**, 12.
- Yamamoto, T. and Horikoshi, M. (1997) Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *J Biol Chem*, **272**, 30595-30598.
- Yedavalli, V.S., Benkirane, M. and Jeang, K.T. (2003) Tat and trans-activation-responsive (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and murine cyclin T1 requires Sp1. *J Biol Chem*, **278**, 6404-6410.
- Ylisastigui, L., Archin, N.M., Lehrman, G., Bosch, R.J. and Margolis, D.M. (2004) Coaxing HIV-1 from resting CD4 T cells: histone deacetylase inhibition allows latent viral expression. *Aids*, **18**, 1101-1108.
- 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.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L. and Charneau, P. (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell*, **101**, 173-185.
- Zhang, L., Chung, C., Hu, B.S., He, T., Guo, Y., Kim, A.J., Skulsky, E., Jin, X., Hurley, A., Ramratnam, B., Markowitz, M. and Ho, D.D. (2000) Genetic characterization of rebounding HIV-1 after cessation of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest*, **106**, 839-845.
- Zhang, L., Ramratnam, B., Tenner-Racz, K., He, Y., Vesanen, M., Lewin, S., Talal, A., Racz, P., Perelson, A.S., Korber, B.T., Markowitz, M. and Ho, D.D. (1999a) Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *N Engl J Med*, **340**, 1605-1613.
- Zhang, Z., Schuler, T., Zupancic, M., Wietgreffe, S., Staskus, K.A., Reimann, K.A., Reinhart, T.A., Rogan, M., Cavert, W., Miller, C.J., Veazey, R.S., Notermans, D., Little, S., Danner, S.A., Richman, D.D., Havlir, D., Wong, J., Jordan, H.L., Schacker, T.W., Racz, P., Tenner-Racz, K., Letvin, N.L., Wolinsky, S. and Haase, A.T. (1999b) Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science*, **286**, 1353-1357.

- Zhou, Y., Zhang, H., Siliciano, J.D. and Siliciano, R.F. (2005) Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4<sup>+</sup> T cells. *J Virol*, **79**, 2199-2210.
- Zhu, C., Rao, K., Xiong, H., Gagnidze, K., Li, F., Horvath, C. and Plevy, S. (2003) Activation of the murine interleukin-12 p40 promoter by functional interactions between NFAT and ICSBP. *J Biol Chem*, **278**, 39372-39382.
- 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.
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M.B. and Price, D.H. (1997) Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev*, **11**, 2622-2632.
- Zilberfarb, V., Pietri-Rouxel, F., Jockers, R., Krief, S., Delouis, C., Issad, T. and Strosberg, A.D. (1997) Human immortalized brown adipocytes express functional beta3-adrenoceptor coupled to lipolysis. *J Cell Sci*, **110**, 801-807.
- Zimmerman, C., Klein, K.C., Kiser, P.K., Singh, A.R., Firestein, B.L., Riba, S.C. and Lingappa, J.R. (2002) Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature*, **415**, 88-92.

## **ANNEXES**

# Research Letters

AIDS 2003, 17:2537–2541

## ***In vitro* infection of human primary adipose cells with HIV-1: a reassessment**

Sandie Munier<sup>a</sup>, Alejandra Borjabad<sup>a</sup>, Morgane Lemaire<sup>a</sup>, Virginie Mariot<sup>a</sup> and Uriel Hazan<sup>a,b</sup>

**We reassessed the infection ability of human primary preadipocytes. The use of X4, R5 or VSV-G pseudotyped viral particles indicated that viral entry is the limiting step. However, transfection with HIV-1 receptors restored efficient infection. Analyses of CD4, CXCR4 and CCR5 expression on preadipocytes and adipocytes revealed that receptor co-expression levels did not permit HIV-1 entry into adipose cells from all biopsies tested. We concluded that adipose tissue cannot be infected with HIV-1 *in vivo*.**

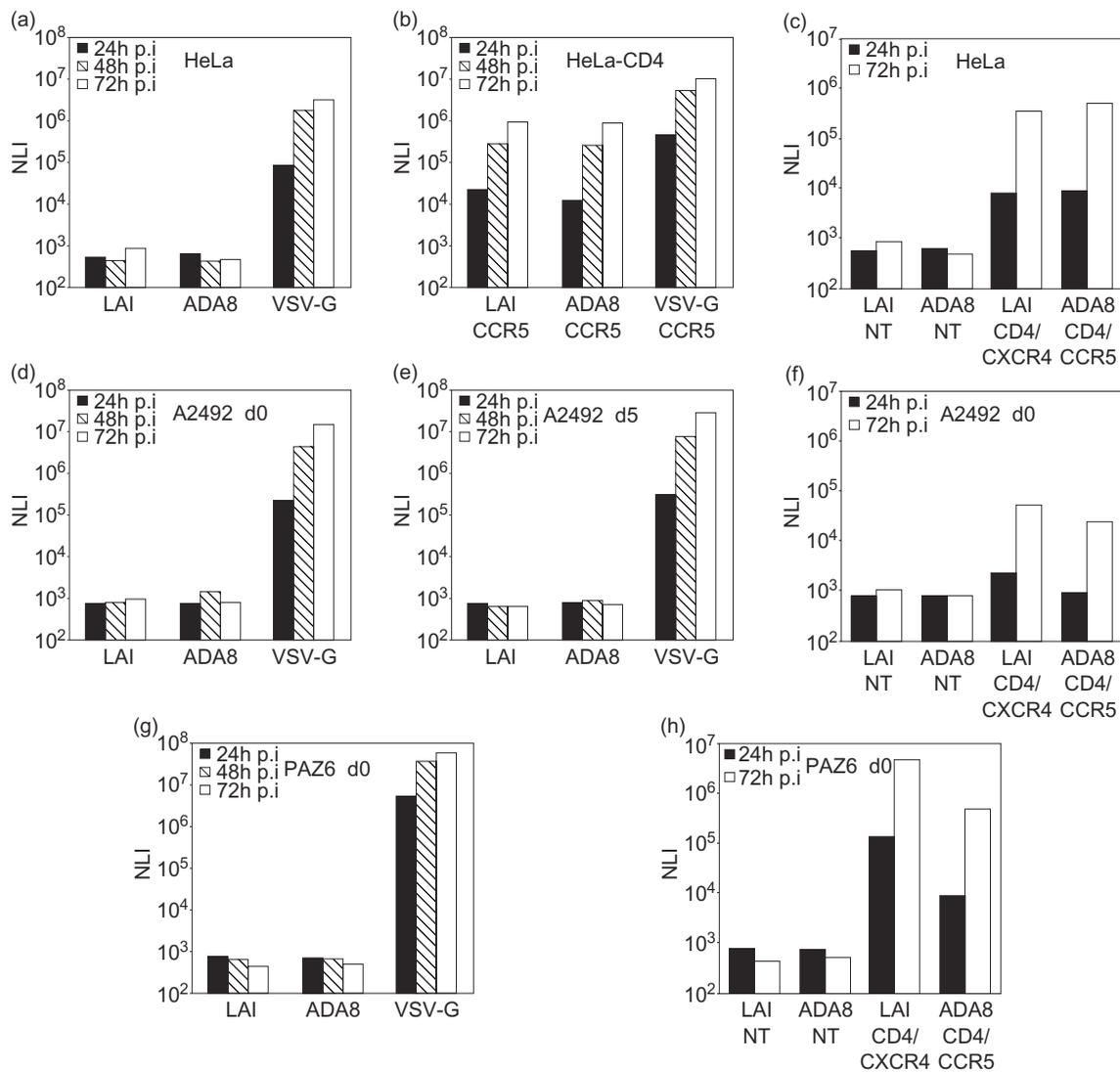
The major target cells for HIV-1 are CD4-positive T lymphocytes and cells from the monocyte and macrophage lineages [1] that are potential reservoirs for HIV-1 *in vivo*. More particularly, HIV-1 can establish a latent infection in resting memory T cells and can be reactivated [2,3]. However, the amplitude of plasma viraemia rebounds after the discontinuation of highly active antiretroviral therapy cannot be explained exclusively by already known reservoirs, suggesting that HIV-1 persists within other reservoirs [4]. We recently reported that human adipose cells express HIV-1 receptors, and showed that these cells could be infected *in vitro* using high viral inputs and resulted in inefficient viral production [5]. Experiments performed on adipose cells from HIV-1-infected patients strongly suggested that viral DNA remained absent from this tissue *in vivo* [6]. The potential ability of the adipose tissue to behave as a new viral reservoir is thus an essential parameter to be determined, in the light of the lipodystrophy syndrome [7]. We therefore investigated whether the low viral production levels previously obtained [5] could be the result of low infection efficiency or low viral replication efficiency.

We first transiently transfected HeLa cells or human primary preadipocytes with the pNL4.3- $\Delta$ env-Luc proviral plasmid. Luciferase activities and p24 production analyses revealed that proviral DNA could be expressed in preadipocytes and results in new viral particle release, indicating that there is no transcriptional block at the level of the HIV-1 promoter (not shown). This ruled out a post-integration restriction.

In order to determine whether viral inhibition was

caused by restricted viral entry, preadipocytes or 5-day differentiated adipocytes were infected with viral particles pseudotyped with an X4 (LAI), an R5 (ADA8) or an amphotropic (VSV-G) envelope glycoprotein. As the receptor for VSV-G is ubiquitous, this model allowed us to analyse the replication of HIV-1 after entry in preadipocytes and adipocytes even in the absence of HIV-1 receptors. No luciferase activity nor p24 production could be detected in HeLa cells (Fig. 1a) after infection with LAI and ADA8 pseudotyped viruses, whereas transfection of CCR5 in HeLa-CD4 cells (P4.2, which constitutively expresses CXCR4) (Fig. 1b) resulted in high luciferase activities [9, 6.10<sup>5</sup> and 9.10<sup>5</sup> normalized luciferase index (NLI) 72 h post-infection, respectively] and p24 production (100–200 pg/ml 72 h post-infection), as expected. When preadipocytes (Fig. 1d) and adipocytes (Fig. 1e) were infected with these pseudotypes, no luciferase activity nor p24 production could be detected. By contrast, infection of preadipocytes and adipocytes with the VSV-G pseudotyped viral particles resulted in strong luciferase signals (1, 5.10<sup>7</sup> NLI 72 h post-infection, Fig. 1d, and 3.10<sup>7</sup> NLI 72 h post-infection, Fig. 1e, respectively), and the production of p24 antigen reached 30 pg/ml in preadipocytes and 140 pg/ml in adipocytes, 72 h post-infection. Luciferase activities were equivalent or higher than those monitored in HeLa cells and were infected with the VSV-G pseudotype (3.10<sup>6</sup> NLI 72 h post-infection, Fig. 1a, and 1.10<sup>7</sup> NLI 72 h post-infection, Fig. 1b), and p24 levels were similar to those detected in HeLa cell supernatants (70 pg/ml). The same experiments were repeated in the PAZ6 human adipose cell line [5], and luciferase activity (6, 2.10<sup>7</sup> NLI 72 h post-infection, Fig. 1g) and p24 release (130 pg/ml 72 h post-infection) were detected after infection with VSV-G but not with LAI and ADA8 pseudotyped viruses. This demonstrated VSV-G pseudotyped virus entry, reverse transcription and expression, and that the entry of LAI and ADA8 pseudotyped viruses in adipose cells was, by contrast, restricted.

We thus assessed whether the expression of the HIV-1 receptors by adipose cells would render these cells susceptible to infection. We therefore transfected preadipocytes or PAZ6 cells with a combination of CD4/CXCR4 or CD4/CCR5 expression plasmids, and infected them 24 h post-transfection with viral particles pseudotyped with LAI or ADA8 envelope glycoproteins. A strong luciferase activity was detected in preadipocytes (5.10<sup>4</sup> NLI and 2, 4.10<sup>4</sup> NLI 72 h post-



**Fig. 1. Infection of preadipocytes and adipocytes with pseudotyped viruses.** HeLa cells (a), HeLa-CD4 cells (P4.2, which constitutively express CXCR4) transfected with CCR5 (b), preadipocytes A2492 day 0 (d), 5-day differentiated adipocytes A2492 day 5 (e) and PAZ6 cells day 0 (g) were infected with 20 ng viral particles pseudotyped with either LAI (X4 tropism), ADA8 (R5 tropism) or VSV-G (extended tropism) envelope glycoproteins. HeLa cells (c), preadipocytes A2492 day 0 (f) and PAZ6 cells day 0 (h) were transfected or not (NT) either with CD4 and CXCR4 or with CD4 and CCR5, as indicated. Twenty-four hours post-transfection, cells were infected with 20 ng pseudotyped viral particles bearing either the LAI (for CD4-CXCR4 transfected cells) or the ADA8 (for CD4-CCR5 transfected cells) envelope glycoproteins, as indicated. Infection efficiencies were monitored by measuring the normalized luciferase index (NLI; defined as the ratio of luciferase activity to protein contents) 24, 48 and 72 h post-infection (p.i.). The background luciferase activity was not deducted from luciferase values; the threshold detection level was therefore 10<sup>3</sup> NLI. Results presented here are representative of three independent experiments.

infection, Fig. 1f) or PAZ6 cells (4, 6.10<sup>6</sup> NLI and 5.10<sup>5</sup> NLI 72 h post-infection, Fig. 1h) previously transfected with CD4 and CXCR4 or CD4 and CCR5, and infected with LAI or ADA8 pseudotyped viruses, respectively, but not in non-transfected control cells. As compared with transfection efficiencies, these luciferase activities were similar to those obtained in HeLa cells transfected with the HIV-1 receptors (3, 4.10<sup>5</sup> NLI 72 h post-infection with LAI and 5.10<sup>5</sup> NLI 72 h post-infection with ADA8, Fig. 1c). In line with

these observations, p24 antigen production could be detected 72 h post-infection with LAI or ADA8 in preadipocyte (20 pg/ml) or in PAZ6 (90 pg/ml) supernatants only in transfected cells. Therefore, infection with viral particles presenting X4 or R5 tropisms could be efficiently restored after the transfection of all necessary HIV-1 entry receptors, confirming that viral entry is the limiting step in adipose cell infection.

As HIV-1 viral entry seems to be a limiting step for

HIV-1 replication in adipose cells, we thus reassessed the *in-vitro* expression of HIV-1 entry receptors on adipose cells. We tested four biopsies from different donors for the expression of CD4, CXCR4 and CCR5 at different timepoints and differentiation stages by microarray experiments. CD4 and CCR5 were never detected on these different biopsies, whereas CXCR4 expression fluctuated depending on cell culture conditions and on the differentiation stage on two out of four biopsies tested (not shown). This was confirmed by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction experiments (not shown). Interestingly, the co-expression of the three receptors at the same timepoint could not be observed on the same cell batch in adipose cells from any of four different donors. Our data strongly suggest that HIV-1 receptor co-expression at high levels is a rare event in adipose cells, which may explain why viral entry is not efficient.

These results clearly demonstrate that infection with HIV-1 was not productive in primary adipose cells, as a result of the absence of all necessary entry receptors. Moreover, once the entry step is bypassed, viral replication takes place efficiently. We thus propose that although adipose cells can be infected *in vitro*, infection occurs only rarely. In the light of recently published *in-vivo* data [6], adipose tissue cannot be considered a target tissue for HIV-1 *in vivo*.

## Acknowledgements

The authors would like to thank Dr P. Sonigo (Institut Cochin) for helpful discussion. They would also like to thank Dr R. Leandri (Clinique Mont-Louis, Paris, France) for providing fat depots and Drs V. Zilberfarb and T. Issad (Institut Cochin) for providing the PAZ6 cell line. S.M. holds a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. A.B. holds a fellowship from the Agence Nationale de la Recherche contre le SIDA (ANRS). Dr D. Perez-Bercoff edited the English.

<sup>a</sup>Institut Cochin, INSERM U567/CNRS UMR8104/Université Paris 5-René Descartes, Département des Maladies Infectieuses, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France; and <sup>b</sup>Université Paris 7-Denis Diderot, UFR de Biochimie, 2 Place Jussieu, 75251 Paris, France.

*Sponsorship:* M.L. is supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche contre le SIDA (ANRS).

*Sidaction (AO12) supported this work.*

*Received:* 17 February 2003; *revised:* 7 May 2003; *accepted:* 3 June 2003.

DOI: 10.1097/01.aids.0000096866.36052.84

## References

1. Clapham PR, McKnight A. **Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses.** *J Gen Virol* 2002, **83**: 1809–1829.
2. Moriuchi H, Moriuchi M, Mizell SB, Ehler LA, Fauci AS. **In vitro reactivation of human immunodeficiency virus 1 from latently infected, resting CD4+ T cells after bacterial stimulation.** *J Infect Dis* 2000, **181**:2041–2044.
3. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. **The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection.** *Annu Rev Med* 2002, **53**:557–593.
4. Chun TW, Davey RT Jr, Ostrowski M, Shawn Justement J, Engel D, Mullins JI, *et al.* **Relationship between pre-existing viral reservoirs and the re-emergence of plasma viremia after discontinuation of highly active anti-retroviral therapy.** *Nat Med* 2000, **6**:757–761.
5. Hazan U, Romero IA, Canello R, Valente S, Perrin V, Mariot V, *et al.* **Human adipose cells express CD4, CXCR4, and CCR5 receptors: a new target cell type for the immunodeficiency virus-1?** *Faseb J* 2002, **16**:1254–1256.
6. Dupin N, Buffet M, Marcelin AG, Lamotte C, Gorin I, Ait-Arkoub Z, *et al.* **HIV and antiretroviral drug distribution in plasma and fat tissue of HIV-infected patients with lipodystrophy.** *AIDS* 2002, **16**:2419–2424.
7. Moyle G, Carr A. **HIV-associated lipodystrophy, metabolic complications, and antiretroviral toxicities.** *HIV Clin Trials* 2002, **3**:89–98.

## The effects of placental malaria on mother-to-child HIV transmission in Rakai, Uganda

Heena Brahmhatt<sup>a</sup>, Godfrey Kigozi<sup>b</sup>, Fred Wabwire-Mangen<sup>c</sup>, David Serwadda, Nelson Sewankambo<sup>c</sup>, Tom Lutalo<sup>b</sup>, Maria J. Wawer<sup>d</sup>, Carlos Abramowsky<sup>e</sup>, David Sullivan<sup>a</sup> and Ronald Gray<sup>a</sup>

**We examined the association of placental malaria and mother-to-child transmission (MTCT) of HIV in a prospective community-randomized trial in Rakai District, Uganda. In the 746 HIV-positive mother-infant pairs, the MTCT rate was 20.4%. Placental malaria was more common in HIV-positive than HIV-negative women. After multivariate adjustment for HIV viral load, the risk of MTCT associated with placental malaria was 2.89 and with HIV viral load the risk was 2.85. Interventions to prevent malaria during pregnancy could potentially reduce MTCT.**

Malaria and HIV-1 are among the most prevalent infectious diseases in sub-Saharan Africa, and co-infections are common in endemic malarious areas. The frequency and severity of malaria is greater in pregnant compared with non-pregnant women [1,2], and results in adverse pregnancy outcomes [1]. Similarly, higher rates of low birthweight, preterm delivery and infant mortality occur in children born to HIV-positive compared with HIV-negative mothers [3]. Therefore, co-infection of malaria and HIV-1 during pregnancy may

# Characterization of two candidate genes, NCoA3 and IRF8, potentially involved in the control of HIV-1 latency

Sandie Munier<sup>1</sup>, Delphine Delcroix<sup>1</sup>, Audrey Gumez<sup>1</sup>, Uriel Hazan<sup>1,2§</sup>

<sup>1</sup>Institut Cochin, INSERM U567 / CNRS UMR-S 8104 / Université Paris 5-René Descartes, Département des Maladies Infectieuses, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France

<sup>2</sup>Université Paris 7-Denis Diderot, UFR de Biochimie, 2 Place Jussieu, 75251 Paris, France

§Corresponding author

Email addresses:

SM: [munier@cochin.inserm.fr](mailto:munier@cochin.inserm.fr)

DD: [delcroix@cochin.inserm.fr](mailto:delcroix@cochin.inserm.fr)

AG: [gumez@cochin.inserm.fr](mailto:gumez@cochin.inserm.fr)

UH: [hazan@cochin.inserm.fr](mailto:hazan@cochin.inserm.fr)

# Abstract

## Background

The persistence of latent HIV-1 reservoirs is the principal barrier preventing the eradication of HIV-1 infection in patients by current antiretroviral therapy. It is thus crucial to understand the molecular mechanisms involved in the establishment, maintenance and reactivation of HIV-1 latency. Since chromatin remodeling has been implicated in the transcriptional reactivation of the HIV-1 promoter, we assessed the role of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate (NaB) on two HIV-1 latently infected cell lines (U1 and ACH-2) gene expression.

## Results

Analysis of microarrays data led us to select two candidate genes: *NCoA3*, a nuclear receptor coactivator and *IRF8*, an interferon regulatory factor. *NCoA3* gene expression is upregulated following NaB treatment of latently infected cells whereas *IRF8* gene expression is strongly downregulated in the promonocytic cell line following NaB treatment. Their differential expressions were confirmed at the transcriptional and translational levels. Moreover, *NCoA3* gene expression was also upregulated after treatment of U1 and ACH-2 cells with PMA but not TSA and after treatment with NaB of two others HIV-1 latently infected cell lines (OM10.1 and J1.1). *IRF8* gene is only expressed in U1 cells and was also downregulated after treatment with PMA or TSA. Functional analyses confirmed that NCoA3 synergizes with Tat to enhance HIV-1 promoter transcription and that IRF8 represses the IRF1-mediated activation through the HIV-1 promoter ISRE element.

## **Conclusions**

These results led us to postulate that NCoA3 could be involved in the transcriptional reactivation of the HIV-1 promoter from latency and that IRF8 may contribute to the maintenance of the latent state in the promonocytic cell line. Implication of these factors in the maintenance or reactivation of the viral latency may provide potential new targets to control HIV-1 replication in latent viral reservoirs.

## **Background**

The use of highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV-1 infected individuals has led to a significant decrease of plasma viremia to undetectable levels and has considerably improved the survival and quality of life of infected individuals (reviewed in [1]). However, the presence of cellular reservoirs that contain latent viruses capable of producing infectious particles after cellular activation lead to a rebound of the viral load after interruption of HAART (reviewed in [2]). The persistence of these latently infected viral reservoirs, despite prolonged HAART treatments, represents a major obstacle to the eradication of HIV-1 in infected patients [3-5]. Therefore, a greater understanding of the molecular mechanisms involved in establishment, maintenance and reactivation of viral latency is essential to expect the reduction of latent HIV-1 reservoirs in infected patients.

Latent HIV-1 infection can exist in many reservoirs, such as macrophages and resting memory CD4<sup>+</sup> T cells (reviewed in [6]). At the cellular level, two major forms of HIV-1 latency have been described: pre- and post-integration latency [7]. CD4<sup>+</sup> T

cells in the post-integration state of latency represent the most stable reservoir for HIV-1 (half-life of 43 months) [8]. Several mechanisms have been proposed to account for the low level of transcription observed during post-integration latency (reviewed in [9]): the inaccessibility of the integrated provirus to the transcriptional machinery, the absence in resting cells of transcription factors involved in HIV-1 gene expression, the presence of transcriptional repressors, and the premature termination of HIV-1 transcription elongation due to the absence of the viral protein Tat and its associated cofactors. Moreover, the chromatin structure appears to be involved in the regulation of HIV-1 gene expression (reviewed in [10]). Indeed, a repressive nucleosome (nuc-1), located immediately downstream of the HIV-1 transcription start site under latency conditions, is disrupted upon transcriptional activation of the HIV-1 promoter in response to Tat, phorbol esters and histone deacetylase (HDAC) inhibitors [11]. Transcriptional activation of the HIV-1 promoter in response to phorbol myristyl acetate (PMA) involves the recruitment of SWI/SNF chromatin remodeling complex [12] and cellular proteins with histone acetyltransferase (HAT) activity [13]. Therefore, chromatin remodeling plays a significant role in the transcriptional reactivation of the HIV-1 promoter from latency. Identification of host transcription factors that may regulate chromatin structure is thus critical to understand the molecular mechanisms involved in HIV-1 reactivation.

Gene expression analysis using high-density microarrays have provided a greater understanding of host-pathogen interactions (reviewed in [14]). Previous microarray studies on HIV-1 have described changes in cellular genes transcription in response to HIV-1 protein expression (Nef [15, 16], Tat [17, 18], gp120 [19] or Vpr [20]) or following acute infection of cell lines [21-24] or Peripheral Blood Mononuclear Cells

(PBMC) [25]. DNA microarrays have also been used to characterize gene expression in latently infected resting CD4<sup>+</sup> T cells in viremic versus aviremic HIV-1 infected individuals [26]. Recently, global gene expression changes in cell lines latently infected with HIV-1 and induced by PMA for completion of viral replication was described by Krishnan *et al.* [27].

To complete the results obtained by Krishnan *et al.*, we used the same strategy to assess the role of the HDAC inhibitor sodium butyrate (NaB) on HIV-1 latently infected cells gene expression. We performed microarray experiments on two HIV-1 latently infected cell lines (U1 and ACH-2) treated or not with NaB to induce viral reactivation. Analysis of microarrays data led us to select two candidate genes encoding transcription factors: NCoA3 (reviewed in [28]), which expression is upregulated following treatment of latently infected cells with NaB, and IRF8 (reviewed in [29]), which expression is downregulated in treated cells. Differential expression of these genes was confirmed at the transcriptional and translational levels. Moreover, *NCoA3* gene expression was also upregulated after treatment of U1 and ACH-2 cells with PMA but not TSA and after treatment with NaB of two others latently infected cell lines (OM10.1 and J1.1). *IRF8* gene is only expressed in U1 cells and was also downregulated after treatment with PMA or TSA. Functional analyses confirmed that NCoA3 synergizes with Tat to enhance HIV-1 promoter transcription and that IRF8 represses the IRF1-mediated activation of the HIV-1 ISRE element. Implication of IRF8 in the maintenance and NCoA3 in the reactivation of the viral latency may thus provide new insights into the control of HIV-1 replication in latent viral reservoirs.

# Results

## Microarray analysis

In order to understand the molecular mechanisms regulating HIV-1 latency, we studied the modifications of cellular transcription using microarrays in the promonocytic U1 and T CD4<sup>+</sup> lymphocytic ACH-2 chronically HIV-1 infected cell lines after reactivation of latency. The two cell lines were treated with 10 mM of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate (NaB). Viral reactivation was monitored by coculture with P4 indicating cells (Figure 1A) and measuring *gag* viral mRNA expression (Figure 1B). Increase in both  $\beta$ -galactosidase activity and *gag* mRNA expression showed that the viral reactivation after NaB treatment was efficient. Total RNAs were extracted after 24 h and sent to the Affymetrix Microarray Facilities for subsequent hybridization on U-133A microarrays.

The pattern of cellular mRNA from chronically infected cells treated with NaB was compared to that from non-treated cells. We used as specific criteria a  $\log_2$  ratio change  $\geq 1$  with a change p-value  $\leq 0.0001$  for increased genes and a  $\log_2$  ratio change  $\leq -1$  with a 1-change p-value  $\geq 0.9999$  for decreased genes. We identified 740 genes that were upregulated by twofold or higher in NaB treated U1 cells and 896 genes that were downregulated, 482 genes in NaB treated ACH-2 cells that had a level increased greater than twofold and 634 genes that had a level decreased greater than twofold (data not shown). Moreover, 260 genes were commonly increased and 337 genes were decreased in both U1 and ACH-2 NaB-treated cells (data not shown).

Pathways involved in regulation of transcription, signal transduction, immune response, protein transport, metabolism, apoptosis and RNAs modifications showed altered expression following treatment with NaB. Some of the genes involved in these pathways are shown in Additional files 1, 2, 3, 4, 5 and 6. Our analysis identified genes that have previously been associated with HIV-1 replication or latency, such as CDK9 [16], Jun [16, 23], PSMB10 [27], MAPK1 [26] or OAS1 [30]. This supported the accuracy of our approach.

Among the differentially expressed genes, we chose to focus on two candidate genes encoding transcription factors: *NCoA3* and *IRF8* (Table 1). We selected these two genes based on their biological properties, their described effects on viral replication [31, 32] and their differential expression observed by microarray experiments. Indeed, *NCoA3* and *IRF8* gene expression are respectively upregulated and downregulated following treatment with NaB of latently infected cells (Table 1). Therefore, *NCoA3* and *IRF8* could be implicated respectively in the reactivation and maintenance of HIV-1 latency.

*NCoA3* gene expression is upregulated following treatment with NaB of both U1 and ACH-2 latently infected cells (Table 1). *NCoA3* (Nuclear Receptor Coactivator 3) is a nuclear receptor coactivator of the Steroid Receptor Coactivator (SRC) family that interacts with nuclear receptors in a ligand-dependent manner and enhances transcriptional activation *via* histone acetylation and recruitment of general transcription factors and additional cofactors (reviewed in [28]). *NCoA3* (Unigene Hs. 382168) gene expression in U1 cells is significantly upregulated by 4.9 to 22.6 fold (U1NaBvsU1 signal  $\log_2$  ratio ranging from 2.3 to 4.5 with a change p-value <

0.00015) following treatment with NaB (Table 1A). Similarly, *NCoA3* gene expression is upregulated in NaB-treated compared to non-treated ACH-2 cells by 2 to 13.9 fold but with a lower significance (ACH2NaBvsACH2 signal log<sub>2</sub> ratio ranging from 1 to 3.8 with a change p-value < 0.0055) (Table 1B).

*IRF8* gene expression is downregulated following treatment of U1 cells with NaB (Table 1A). IRF8 (Interferon Regulatory Factor 8) is a transcription factor of the Interferon (IFN) Regulatory Factor (IRF) family that binds to IFN-stimulated response element (ISRE) and regulates expression of genes stimulated by IFNs (reviewed in [29]). *IRF8* (Unigene Hs. 137427) is expressed in the promonocytic cell line U1 (detection signal of 707.9 with a p-value of 0.000244) (Table 1A) but is not expressed in the T CD4<sup>+</sup> lymphocytic cell line ACH-2 (data not shown). Following NaB treatment, *IRF8* gene expression in U1 cells is downregulated by 16 fold (U1NaBvsU1 signal log<sub>2</sub> ratio of -4 with a 1-change p-value of 0.99998) (Table 1A).

### **Validation of NCoA3 and IRF8 differential transcriptional expression**

Real-time RT-PCR quantifications were performed to confirm that *NCoA3* and *IRF8* genes were differentially expressed in the NaB-treated chronically infected cells compared to the non-treated cells. We performed quantification on RNA samples obtained from five independent NaB treatments of U1 and ACH-2 cells and real-time RT-PCR experiments were run in duplicate. *NCoA3* and *IRF8* expressions were normalized to the expression of *Cyclophilin A*. The results show in Figure 2 represent the *NCoA3* expression increase fold (Figure 2A) obtained from U1 and ACH-2 cells and the *IRF8* expression decrease fold (Figure 2B) obtained from U1 cells treated

with NaB for 24 h and 48 h compared to non-treated cells. Concerning *NCoA3*, real-time RT-PCR showed an upregulation consistent with microarray data in 24 h NaB-treated U1 cells of  $8.34 \pm 2.42$  fold compared to non-treated cells (Figure 2A). *NCoA3* gene expression is also increased with a 48 h NaB treatment (upregulation of  $8.40 \pm 2.33$  fold) (Figure 2A). Similarly, an increase of *NCoA3* gene expression can be observed on ACH-2 cells following treatment with NaB (upregulation of  $4.56 \pm 1.28$  fold in 24 h and  $6.80 \pm 2.34$  fold in 48 h NaB-treated ACH-2 cells) (Figure 2A). Concerning *IRF8*, real-time RT-PCR showed a  $14.96 \pm 4.85$  fold decrease in 24 h NaB-treated U1 cells (Figure 2B) in correlation with the microarray ratio previously obtained. Downregulation of *IRF8* gene expression is also observed following 48 h NaB-treatment of U1 cells ( $22.06 \pm 11.29$  fold decrease) (Figure 2B). Taken together, results from real-time RT-PCR performed on *NCoA3* and *IRF8* genes corroborate with those obtained using microarray hybridizations.

We next determined whether *NCoA3* and *IRF8* gene expression were similarly modified in the uninfected parental cell lines. U937 and CEM cells were subjected to identical treatment and RT-PCR quantifications were performed (Figure 3). *NCoA3* is upregulated both in U937 and CEM cells following treatment with NaB (upregulation of  $7.32 \pm 1.74$  fold in 24 h and  $11.45 \pm 2.95$  fold in 48 h NaB-treated U937 cells, upregulation of  $1.93 \pm 1.04$  fold in 24 h and  $5.59 \pm 0.06$  fold in 48 h NaB-treated CEM cells) (Figure 3A). *IRF8* is only expressed in the promonocytic cell line U937 and, as in U1 cells, its expression was downregulated after NaB treatment (downregulation of  $17.95 \pm 4.15$  fold in 24 h and  $22.32 \pm 10.82$  fold in 48 h NaB-treated U937 cells) (Figure 3B). Thus, NaB treatment modify *NCoA3* and *IRF8* gene

expression in uninfected parental cell lines U937 and CEM at a similar level than in chronically infected cells.

We then performed additional experiments to determine whether the gene expression variations observed could also be mediated by treatments with the phorbol ester PMA and another HDAC inhibitor, trichostatin A (TSA). We thus assessed the differential regulation of *NCoA3* and *IRF8* gene expression in U1 and ACH-2 cells treated with PMA or TSA (Figure 4). Results indicated that *NCoA3* expression is upregulated by 24 h and 48 h PMA treatment of U1 and ACH-2 cells (upregulation of  $5.70 \pm 1.37$  fold in 24 h and  $9.85 \pm 0.90$  fold in 48 h PMA-treated U1 cells, upregulation of  $3.12 \pm 1.05$  fold in 24 h and  $7.12 \pm 1.20$  fold in 48 h PMA-treated ACH-2 cells (Figure 4A). However, TSA treatment had no significant effect on *NCoA3* expression in U1 and ACH-2 cells, although TSA increased viral expression (data not shown). Concerning *IRF8* expression in U1 cells, PMA and TSA treatments for 24 h induced a decrease of  $3.22 \pm 0.45$  fold and  $5.32 \pm 1.09$  fold, respectively (Figure 4B). These results show that *NCoA3* expression is upregulated following phorbol ester but not with other HDAC inhibitor treatments in U1 and ACH-2 cells. Moreover, *IRF8* gene expression in U1 cells is downregulated with PMA or TSA treatments but at a lower extent than with NaB.

We also assessed the differential regulation of *NCoA3* and *IRF8* gene expression in others chronically HIV-1 infected cell lines. The chronically infected promonocytic OM10.1 and T CD4<sup>+</sup> lymphocytic J1.1 cell lines were treated with NaB for 24 h and 48 h and real-time RT-PCR were performed to measure *NCoA3* and *IRF8* gene expression. As shown in Figure 5, *NCoA3* expression is upregulated by  $4.94 \pm 0.78$

fold in OM10.1 and by  $2.56 \pm 0.64$  fold in J1.1 after 24 h NaB treatment. *NCoA3* expression increased with time of NaB treatment in both cell lines (upregulation of  $12.89 \pm 3.10$  fold in OM10.1 and  $3.51 \pm 0.69$  fold in J1.1 cells) (Figure 5). Like ACH-2 and unlike U1 cells, the T CD4<sup>+</sup> lymphocytic J1.1 and the promonocytic OM10.1 cell lines did not express *IRF8* (data not shown). Thus, the differential regulation of *NCoA3* but not *IRF8* gene expression is similar in two other related latently HIV-1 infected cell line models.

### **Validation of NCoA3 and IRF8 differential translational expression**

To confirm that the changes seen at the RNA level correlated with protein levels, we performed Western blot experiments on nuclear extract of U1, ACH-2, OM10.1 and J1.1 cells treated or not with NaB for 24 h (Figure 6). Results indicated that NaB increased the expression level of NCoA3 protein in U1, ACH-2, OM10.1 and to some extent in J1.1 cells (Figure 6). Moreover, IRF8 protein expression is strongly downregulated in U1 cells following NaB treatment (Figure 6). These results correlate with the differential expression of *NCoA3* and *IRF8* genes observed with both microarray and real-time RT-PCR experiments.

### **Transcriptional activation of the HIV-1 promoter by NCoA3**

We analyzed the functional role of NCoA3 on viral transcription by transfection assays. HEK293 cells were cotransfected with pLTRX-luc reporter plasmid containing the luciferase gene under the control of the HIV-1 U3-R promoter region

(nt -640 to +78) with or without Tat and/or NCoA3 expression vectors. As shown in Figure 7, NCoA3 increased Tat-stimulated HIV-1 LTR activity by  $2.8 \pm 1.4$  fold. The presence of NCoA3 had synergistic effect on the HIV-1 LTR activity induced by suboptimal expression of Tat. When HEK293 cells were transfected with pLTR $\Delta$ TAR-luc reporter plasmid lacking the Tat-transactivation response element TAR, Tat was not able to activate the LTR transcription, as expected, and NCoA3 had no effect on the LTR activity (Figure 7). Thus, functional analyses confirm that NCoA3 synergizes with Tat to enhance HIV-1 promoter transcription, as expected [31], and that this effect is dependent on the presence of the TAR region.

### **Transcriptional repression of the HIV-1 ISRE element by IRF8**

We analyzed the functional role of IRF8 on viral transcription by transfection assays. HEK293 cells were cotransfected with pISRE-TK-luc reporter plasmid corresponding to the HIV-1 IFN-stimulated response element, located downstream transcription start site (nt +194 to +223) [33], with or without IRF1 and/or IRF8 expression vectors. As shown in Figure 8, the basal activity of the ISRE-TK was increased by  $7.4 \pm 1.0$  fold in the presence of IRF1 as expected [32], whereas a decrease was detected in the presence of IRF8 ( $21.9 \pm 10.6$  to  $41.4 \pm 9.5$  %). The expression of IRF8 inhibited by  $43.5 \pm 10.6$  to  $74.7 \pm 2.5$  % the IRF1-mediated activation of the ISRE-TK in a dose dependent fashion (Figure 8). The expression of the dominant negative IRF8 DNA-binding domain (IRF8-DBD) inhibited by  $76.4 \pm 6.5$  % the IRF1-mediated activation of the ISRE-TK, as expected [34] (Figure 8). The inhibitory effects of IRF8 and IRF8-DBD expression and activation effect of IRF1 expression was abolished when the ISRE sequence was mutated (pISREmut-TK-luc, Figure 8). These results confirm that

IRF8 represses the HIV-1 promoter transcription, as expected [32], through the ISRE element.

## Discussion

The existence of long-lasting HIV-1 reservoirs is the principal barrier preventing the eradication of HIV-1 infection in patients by current antiretroviral therapy. It is thus crucial to understand the molecular mechanisms involved in establishment, maintenance and reactivation of HIV-1 latency. In this study, the role of the HDAC inhibitor NaB on HIV-1 latently infected cells gene expression was explored using microarrays. Since chromatin remodeling is involved in the regulation of HIV-1 gene expression (reviewed in [10]), differential expression of cellular genes in latently infected cells following treatment with NaB might be related to the maintenance and reactivation of latency.

Recently, Krishnan *et al.* [27] described the global gene expression changes in HIV-1 latently infected cell lines treated or not with PMA to induce viral reactivation compared to the uninfected parental cell lines treated under the same conditions. Here, we compared gene expression profiles of two HIV-1 latently infected cell lines (U1 and ACH-2) treated with NaB to that of non-treated corresponding cell lines. We thus avoided identification of genes which differential expression could result from the establishment and cloning of the chronically infected cell lines. Based on our specific criteria, we identified few hundreds of genes affected by NaB treatment implicated in biological pathways previously shown to be modulated by HIV-1 replication. For

example, reactivation of latency induced an upregulation of CDK9, the catalytic component of transcription elongation factor b (P-TEFb), which acts in concert with Tat to direct the processivity of HIV-1 transcription. It was shown that CDK9 mRNA and protein levels are induced following T cell activation and Nef expression, and that this correlates with kinase activity, thus enhancing HIV-1 transcription [16, 35].

After NaB treatment of latently infected cell lines, we observed an upregulation of genes involved in vesicular transport of protein like syntaxin and nexin. It was found by Chun *et al.* that numerous genes involved in protein/vesicle transport are upregulated in resting T CD4<sup>+</sup> cells of viremic patients, strongly suggesting that enhanced activities in secretory pathways may help in the assembly and release of viral particles [26]. Recently, it was shown that multiple genes involved in cholesterol synthesis are induced by Nef [36]. NaB treatment also induced some of these genes (INSIG1, HMGCS1, IDI1, LSS or SREBF1) and could thus enhanced virion infectivity and viral replication.

Krishnan *et al.* have described an increase in expression of several proteasome subunits in ACH-2 cells prior induction of lytic replication by PMA and proposed that the higher expression of proteasomes may lead to increased degradation of HIV-1 mRNA [27]. After induction of lytic replication by NaB, proteasome subunits PSMB10 and PSMB8 were downregulated in ACH-2 and U1 cells, suggesting a role in the maintenance of the latent state. Indeed, reactivation of latency was achieved with proteasome inhibitors [27]. Among the downregulated genes after NaB treatment, we identified genes involved in RNA modifications. Krishnan *et al.* have shown alterations in the expression of DEAD-box and other RNA binding proteins during HIV-1 replication [37]. Especially, DDX18 and DDX39 are upregulated in latently infected cells [37]. After NaB treatment of latently infected cells, we observed

a decrease in the expression of these two proteins, thus providing more support for their role in maintaining HIV-1 latency.

Analysis of microarray data led us to focus on two candidate genes previously described to influence viral expression and that may be involved in reactivation and maintenance of latency: *NCoA3* and *IRF8*, respectively.

NCoA3 is a nuclear receptor coactivator that enhances ligand-induced transcriptional activation of nuclear receptors (reviewed in [28]). We show that *NCoA3* (Unigene Hs. 382168) gene expression is upregulated following treatment with NaB of U1 and ACH-2 latently infected cells. This differential transcriptional expression was confirmed by real-time RT-PCR and is also mediated by PMA but not TSA.

Upregulation of NCoA3 is thus achieved following phorbol ester but not other HDAC inhibitor treatment. However, NaB and TSA act on different pathways and at different concentrations and target different genes [38]. Transcriptional increase of NCoA3 was observed in parental uninfected corresponding cell lines U937 and CEM and in two others latently HIV-1 infected cell lines, OM10.1 and J1.1. NCoA3 protein level is also upregulated following treatment with NaB. Moreover, NCoA3 increases the Tat-induced HIV-1 LTR promoter transcriptional activity through the TAR region, in accordance with other data [31]. The differential expression of NCoA3 observed led us to postulate that NCoA3 could be involved in the transcriptional reactivation of the HIV-1 promoter from latency, at low concentrations of Tat.

This hypothesis is supported by several findings. Previous microarray studies on latently infected resting CD4<sup>+</sup> T cells in infected individuals have shown an upregulation of NCoA3 gene expression in viremic versus aviremic patients [26].

Moreover, Kino *et al.* showed that NCoA factors improve Tat transactivation of HIV-

1 LTR promoter activity and interact with Tat [31]. Tat transactivation activity is mediated by its interaction with components of the basal transcription machinery (including TBP, TAFII250, RNA polymerase II), with kinase complexes able to phosphorylate the C-terminal domain of RNA polymerase II (in particular with the P-TEFb complex composed of cyclin T1/CDK9) and with cellular proteins possessing HAT activity (p300/CBP, P/CAF and GCN5) (reviewed in [39]). Kino *et al.* showed that one member of the family, NCoA2, functions as a Tat coactivator on the HIV-1 LTR by bridging promoter-bound proteins with the Tat-P-TEFb complex through its interaction with Tat and Cyclin T1 [31]. Stimulation of Tat transactivation activity by NCoA3 could involve similar mechanisms.

Furthemore, it has been recently demonstrated that recruitment of HATs to the LTR is an early event in HIV-1 transcriptional activation [13] and that a consequence of histone acetylation is the recruitment of the ATP-dependent chromatin remodeling complex hSWI/SNF to the LTR [12]. NCoA3 could mediate chromatin remodeling by recruitment of additional cofactors with HAT activity (such as p300/CBP and P/CAF) and by an intrinsic HAT activity [40] and may thus contribute to the transcriptional reactivation of the HIV-1 promoter from latency.

IRF8 is a transcription factor that binds to IFN-stimulated response element (ISRE) and regulates expression of genes stimulated by IFNs (reviewed in [29]). IRF8 is able to both activate and repress gene transcription depending on the target gene. We show that *IRF8* (Unigene Hs. 137427) gene is only expressed in the promonocytic cell line U1 and its expression is strongly downregulated following NaB treatment of these cells. This differential transcriptional expression was confirmed by real-time RT-PCR and is also observed, albeit at lower extent, after PMA and TSA treatments of U1

cells. IRF8 protein level is similarly downregulated following treatment with NaB. Moreover, IRF8 represses the IRF1-mediated activation of the HIV-1 ISRE element of the LTR, in accordance with other data [32]. The decreased expression of IRF8 following reactivation of latency using different molecules suggest that IRF8 may contribute in the maintenance of the latent state in the promonocytic cell line. It has been shown that binding of specific transcription factors downstream of the HIV-1 transcription start site is crucial to control HIV-1 transcription [33, 41]. Among these sites is an ISRE element that recruits IRF1 and IRF2 *in vivo* [33]. Previous studies have investigated the role of IRFs on the modulation of HIV-1 replication (reviewed in [42, 43]) and showed that IRF1 activates HIV-1 LTR transcription, interacts with Tat [32] and increases HIV-1 replication [44]. However, IRF8 represses IRF1-Tat-mediated transactivation of the LTR by interfering with IRF1-Tat association [32]. Moreover, it has been shown that IRF8 inhibits HIV-1 replication in T CD4<sup>+</sup> lymphocytic and promonocytic cell lines [32, 34]. These data support the hypothesis that repression of HIV-1 transcription by IRF8 could be implicated in the maintenance of proviral quiescence in latently infected cells.

Chronically HIV-1 infected cell lines used in this study provide useful models for studying HIV-1 latency but are not in a quiescent state as cellular reservoirs *in vivo*. Moreover, it has been shown that mutations in the *tat* gene and in the TAR sequence are responsible for the latency observed in U1 and ACH-2 cells, respectively [45, 46]. We thus confirmed the differential expression of *NCoA3* but not *IRF8* genes in two others chronically HIV-1 infected cell lines, OM10.1 and J1.1. We will now investigate the involvement of NCoA3 and IRF8 to regulate viral expression in primary cells such as resting T CD4<sup>+</sup> lymphocytes or macrophages.

## **Conclusions**

Additional experiments are currently underway to validate the biological relevance of the differential expression of IRF8 and NCoA3 genes in latency maintenance and reactivation. Since the persistence of integrated HIV-1 genomes despite potent suppression of viral replication is a major obstacle for current antiretroviral therapy, selective disruption of the HIV-1 proviral latency may provide good strategies to decrease latent HIV-1 reservoirs. Thus, identification of cellular genes that are differentially expressed during HIV-1 reactivation of latency is crucial to understand the molecular mechanisms involved in the control of HIV-1 latency.

## **Methods**

### **Cell cultures and treatments**

The chronically HIV-1 infected T CD4<sup>+</sup> lymphocytic cell lines ACH-2 [47] and J1.1 [48] derived from CEM and Jurkat cells respectively, and the chronically HIV-1 infected promonocytic cell lines U1 [49] and OM10.1 [50] derived from U937 and HL-60 cells respectively, were obtained through the National Institutes of Health (NIH) AIDS Research and Reference Reagent Program. Suspension cell lines were grown in RPMI 1640 (Invitrogen) with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin (Invitrogen) and 2 mM glutamine

(Invitrogen). Cells were treated with 10 mM of sodium butyrate (NaB; Sigma), or with 10 ng/mL of phorbol myristyl acetate (PMA; Sigma), or with 300 nM of Trichostatin A (TSA; Sigma). Cells were harvested 24 h and 48 h after treatment for subsequent RNA extraction or nuclear extract preparation. P4 indicator cells are HeLa CD4<sup>+</sup> cells carrying the *lacZ* gene under the control of the HIV-1 LTR. P4 and HEK293 cells were grown in DMEM (Invitrogen) containing 5% fetal bovine serum (Invitrogen), 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin (Invitrogen) and 2 mM glutamine (Invitrogen).

## Plasmids

The pLTRX-luc construct contains the luciferase (*luc*) gene downstream of the HIV-1 BRU U3-R promoter region (nt -640 to +78) [51]. The pLTRΔTAR-luc construct corresponds to the pLTRX-luc plasmid in which the TAR region (nt +38 to +78) was deleted [51]. The pCMV-Tat expression vector was kindly provided by S. Emiliani (Institut Cochin, Paris, France). The pIRF8 expression vector (pcDNAmycHis-ICSBP) and dominant negative construct pIRF8-DBD, which contains the DNA binding domain of IRF8, were a kind gift of B.Z. Levi (Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel). The pNCoA3 expression vector (pcDNA3.1-AIB1) was a kind gift of P.S. Meltzer (NIH, Bethesda, USA) [52]. The pIRF1 construct was generated by cloning the fragment excised from pHuIRF-3-1 (a kind gift of T. Taniguchi, University of Tokyo, Tokyo, Japan) by *Hind*III / *Not*I digestion in the pcDNA3.1 plasmid (Invitrogen). The pISRE-TK-luc and pISREmut-TK-luc constructs were generated by cloning a wild-type (AGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAG) or mutated

(AGGGACTTGCCCGCGCCCGGGAAACCAGAG) synthetic oligonucleotide corresponding to the HIV-1 BRU Interferon-stimulated response element (ISRE) sequence (nt +194 to +223) [33, 53] in the pTK-luc plasmid in which the luciferase gene is under the control of the truncated HSV-1 thymidine kinase promoter minimum region [51]. The pCMV-LacZ was kindly provided by M. Alizon (Institut Cochin, Paris, France).

### **Total RNA extraction**

Total RNAs were extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). The procedure included an “on-column” DNase I digestion step according to the manufacturer’s instructions. RNA quality was assessed using the Agilent Bioanalyzer 2100 and spectrophotometric analysis prior to cDNA synthesis.

### **Microarray experiments**

Microarray experiments were performed using the U133-A microarrays (Affymetrix) containing 22283 oligonucleotides spots. Total RNAs obtained from chronically infected U1 and ACH-2 stimulated or not with NaB for 24 h were sent to Dr. C. Thibault (Affymetrix Microarray Facilities, IGBMC, Strasbourg, France) for amplification, labeling and hybridization. Results were then analyzed with the Mas5.0 Software (Affymetrix) and interpreted using the Data Mining Tool (Affymetrix) and Microsoft Excel softwares. For individual analyses, the p-value cut off was 0.048 as suggested by Affymetrix. For comparative analyses, a  $\log_2$  ratio change  $\geq 1$  for

increased genes and  $\leq -1$  for decreased genes were defined. Gene expression changes were considered to be significant when the change p-value was  $\leq 0.0001$  for increased genes and 1-change p-value  $\geq 0.9999$  for decreased genes.

### **Real-time RT-PCR**

Quantifications of cellular RNAs were performed using a Light Cycler instrument (Roche Diagnostics). Briefly, cDNAs were synthesized from 1  $\mu\text{g}$  of total RNA with MoMLV reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen) and 1/10<sup>th</sup> aliquots of the corresponding samples were used for real-time PCR in a 20  $\mu\text{L}$  reaction mixture containing 1X LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics), 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 500 nM of each primer. The reactions were carried out in duplicate and the results were normalized to the expression of Cyclophilin A. Primers for quantitative PCR were designed using Oligo 6 software. All primer pairs produced single amplification product as determined by melting curve analyses. The sequences of the primers used were (5' to 3'): NCoA3 forward CTTTGGGCATTCCTGAACTTGTC, NCoA3 reverse GCCTCATCACCGCAGCAC, IRF8 forward GGAGTGCGGTCGCTCTGAAA, IRF8 reverse GTCGTAGGTGGTGTACCCCGTCA, Cyclophilin A forward AGTGGTTGGATGGCAAGC, Cyclophilin A reverse GATTCTAGGATACTGCGAGCAAA. PCR reactions were carried out with a denaturation step of 10 min at 95°C followed by forty-five cycles of 10 s at 95°C, 5 s at annealing temperature (55°C for NCoA3 and Cyclophilin A, 59°C for IRF8) and 20 s amplification at 72°C. Quantifications of cDNAs were determined in reference to a standard curve prepared by amplification of serial dilutions of PCR product

containing matching sequences. Analyses were performed using the second-derivative-maximum method provided by the Light Cycler quantification software, version 3.5 (Roche Diagnostics).

Quantification of *gag* viral mRNA was performed by real-time RT-PCR as described in [54].

### **Nuclear extracts preparation**

For nuclear extract preparation,  $10 \cdot 10^6$  cells were harvested, washed and nuclei were isolated by addition of 150  $\mu$ L of buffer I (50 mM Tris pH 7.9, 10 mM KCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 0.2% NP40) followed by a centrifugation at 3000 g for 3 min. Nuclear extracts were prepared by addition of 15  $\mu$ L of buffer II (20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 10 mM KCl, 20% glycerol, 1 mM EDTA) for 20 min at 4°C followed by a centrifugation at 15000 g for 10 min. Protein concentrations were determined by the Bio-Rad protein assay.

### **Western blot analysis**

Nuclear extracts (100  $\mu$ g) were loaded on 8% SDS-polyacrylamide gel and the proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-C, Amersham) that was subsequently blocked for 1 h with 5% non-fat dry milk in PBS-T (PBS, 0.05% Tween20) and incubated with antibodies directed against NCoA3 (goat polyclonal anti-ACTR C-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), IRF8 (goat polyclonal anti-ICSBP C-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) or actin (mouse monoclonal anti-actin,

Calbiochem) for 2 h. The membranes were then washed and incubated with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP conjugated rabbit anti-goat (DakoCytomation) or goat anti-mouse (Calbiochem) immunoglobulins).

Hybridizations were revealed using an ECL enhanced chemiluminescence kit (ECL, Amersham).

### **Transient transfection and enzymatic assays**

HEK293 cells were transfected using calcium phosphate co-precipitation method.

Cells were lysed 24 h after transfection with a buffer containing 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.5 mM EDTA, 50 mM β-

mercaptoethanol and 0.125% Nonidet P-40. Luciferase activities were measured as

previously described [55]. Cotransfection with pCMV-LacZ plasmid was performed

to normalize transfection efficiency and β-galactosidase activities were determined

using Chlorophenol red β-D-galactopyranoside (CPRG, Roche Diagnostics) assay as

previously described [55]. The normalized luciferase index (NLI) was defined as the

ratio of luciferase to β-galactosidase activities.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

SM performed the microarray analyses, real-time RT-PCR and drafted the manuscript. DD carried out real-time RT-PCR, Western blot and transfection experiments. AG participated in transfection experiments. UH conceived the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We thank Drs. S. Emiliani, B.Z. Levi, P.S. Meltzer, T. Taniguchi, M. Alizon for providing plasmids, and the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program for the kind gift of reagents. We are grateful to Dr. C. Thibault for her precious help in microarray hybridization data mining. S.M. is supported by a grant from Sidaction. Sidaction (AO15) supported this work. We thank S. Nisole for helpful discussion.

## References

1. Pomerantz RJ, Horn DL: **Twenty years of therapy for HIV-1 infection.** *Nat Med* 2003, **9**:867-873.
2. Pierson T, McArthur J, Siliciano RF: **Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy.** *Annu Rev Immunol* 2000, **18**:665-708.

3. Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD: **Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia.** *Science* 1997, **278**:1291-1295.
4. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, et al: **Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy.** *Science* 1997, **278**:1295-1300.
5. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA, Fauci AS: **Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:13193-13197.
6. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF: **The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection.** *Annu Rev Med* 2002, **53**:557-593.
7. Lassen K, Han Y, Zhou Y, Siliciano J, Siliciano RF: **The multifactorial nature of HIV-1 latency.** *Trends Mol Med* 2004, **10**:525-531.
8. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, et al: **Latent infection of CD4(+) T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy.** *Nat Med* 1999, **5**:512-517.
9. Williams SA, Greene WC: **Host factors regulating post-integration latency of HIV.** *Trends Microbiol* 2005, **13**:137-139.
10. He G, Ylisastigui L, Margolis DM: **The regulation of HIV-1 gene expression: the emerging role of chromatin.** *DNA Cell Biol* 2002, **21**:697-705.

11. Verdin E, Paras P, Jr., Van Lint C: **Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation.** *Embo J* 1993, **12**:3249-3259.
12. Henderson A, Holloway A, Reeves R, Tremethick DJ: **Recruitment of SWI/SNF to the human immunodeficiency virus type 1 promoter.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**:389-397.
13. Lusic M, Marcello A, Cereseto A, Giacca M: **Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter.** *Embo J* 2003, **22**:6550-6561.
14. Kato-Maeda M, Gao Q, Small PM: **Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts.** *Cell Microbiol* 2001, **3**:713-719.
15. Shaheduzzaman S, Krishnan V, Petrovic A, Bittner M, Meltzer P, Trent J, Venkatesan S, Zeichner S: **Effects of HIV-1 Nef on cellular gene expression profiles.** *J Biomed Sci* 2002, **9**:82-96.
16. Simmons A, Aluvihare V, McMichael A: **Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators.** *Immunity* 2001, **14**:763-777.
17. De la Fuente C, Santiago F, Deng L, Eadie C, Zilberman I, Kehn K, Maddukuri A, Baylor S, Wu K, Lee CG, et al: **Gene expression profile of HIV-1 Tat expressing cells: a close interplay between proliferative and differentiation signals.** *BMC Biochem* 2002, **3**:14.
18. Izmailova E, Bertley FM, Huang Q, Makori N, Miller CJ, Young RA, Aldovini A: **HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages.** *Nat Med* 2003, **9**:191-197.

19. Cicala C, Arthos J, Selig SM, Dennis G, Jr., Hosack DA, Van Ryk D, Spangler ML, Steenbeke TD, Khazanie P, Gupta N, et al: **HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:9380-9385.
20. Janket ML, Manickam P, Majumder B, Thotala D, Wagner M, Schafer EA, Collman RG, Srinivasan A, Ayyavoo V: **Differential regulation of host cellular genes by HIV-1 viral protein R (Vpr): cDNA microarray analysis using isogenic virus.** *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **314**:1126-1132.
21. Corbeil J, Sheeter D, Genini D, Rought S, Leoni L, Du P, Ferguson M, Masys DR, Welsh JB, Fink JL, et al: **Temporal gene regulation during HIV-1 infection of human CD4+ T cells.** *Genome Res* 2001, **11**:1198-1204.
22. Geiss GK, Bumgarner RE, An MC, Agy MB, van 't Wout AB, Hammersmark E, Carter VS, Upchurch D, Mullins JI, Katze MG: **Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays.** *Virology* 2000, **266**:8-16.
23. Van 't Wout AB, Lehrman GK, Mikheeva SA, O'Keeffe GC, Katze MG, Bumgarner RE, Geiss GK, Mullins JI: **Cellular gene expression upon human immunodeficiency virus type 1 infection of CD4(+)-T-cell lines.** *J Virol* 2003, **77**:1392-1402.
24. Wen W, Chen S, Cao Y, Zhu Y, Yamamoto Y: **HIV-1 infection initiates changes in the expression of a wide array of genes in U937 promonocytes and HUT78 T cells.** *Virus Res* 2005.
25. Vahey MT, Nau ME, Jagodzinski LL, Yalley-Ogunro J, Taubman M, Michael NL, Lewis MG: **Impact of viral infection on the gene expression profiles of**

- proliferating normal human peripheral blood mononuclear cells infected with HIV type 1 RF. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002, 18:179-192.**
26. Chun TW, Justement JS, Lempicki RA, Yang J, Dennis G, Jr., Hallahan CW, Sanford C, Pandya P, Liu S, McLaughlin M, et al: **Gene expression and viral production in latently infected, resting CD4+ T cells in viremic versus aviremic HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:1908-1913.**
27. Krishnan V, Zeichner SL: **Host cell gene expression during human immunodeficiency virus type 1 latency and reactivation and effects of targeting genes that are differentially expressed in viral latency. *J Virol* 2004, 78:9458-9473.**
28. Xu J, Li Q: **Review of the in vivo Functions of the p160 Steroid Receptor Coactivator Family. *Mol Endocrinol* 2003, 12:12.**
29. Levi BZ, Hashmueli S, Gleit-Kielmanowicz M, Azriel A, Meraro D: **ICSBP/IRF-8 transactivation: a tale of protein-protein interaction. *J Interferon Cytokine Res* 2002, 22:153-160.**
30. Bosinger SE, Hosiawa KA, Cameron MJ, Persad D, Ran L, Xu L, Boulassel MR, Parenteau M, Fournier J, Rud EW, Kelvin DJ: **Gene expression profiling of host response in models of acute HIV infection. *J Immunol* 2004, 173:6858-6863.**
31. Kino T, Slobodskaya O, Pavlakis GN, Chrousos GP: **Nuclear receptor coactivator p160 proteins enhance the HIV-1 long terminal repeat promoter by bridging promoter-bound factors and the Tat-P-TEFb complex. *J Biol Chem* 2002, 277:2396-2405.**

32. Sgarbanti M, Borsetti A, Moscufo N, Bellocchi MC, Ridolfi B, Nappi F, Marsili G, Marziali G, Coccia EM, Ensoli B, Battistini A: **Modulation of human immunodeficiency virus 1 replication by interferon regulatory factors.** *Journal of Experimental Medicine* 2002, **195**:1359-1370.
33. Van Lint C, Amella CA, Emiliani S, John M, Jie T, Verdin E: **Transcription factor binding sites downstream of the human immunodeficiency virus type 1 transcription start site are important for virus infectivity.** *J Virol* 1997, **71**:6113-6127.
34. Thornton AM, Ogryzko VV, Dent A, Sharf R, Levi BZ, Kanno Y, Staudt LM, Howard BH, Ozato K: **A dominant negative mutant of an IFN regulatory factor family protein inhibits both type I and type II IFN-stimulated gene expression and antiproliferative activity of IFNs.** *J Immunol* 1996, **157**:5145-5154.
35. Herrmann CH, Carroll RG, Wei P, Jones KA, Rice AP: **Tat-associated kinase, TAK, activity is regulated by distinct mechanisms in peripheral blood lymphocytes and promonocytic cell lines.** *J Virol* 1998, **72**:9881-9888.
36. Van 't Wout AB, Swain JV, Schindler M, Rao U, Pathmajeyan MS, Mullins JI, Kirchhoff F: **Nef induces multiple genes involved in cholesterol synthesis and uptake in human immunodeficiency virus type 1-infected T cells.** *J Virol* 2005, **79**:10053-10058.
37. Krishnan V, Zeichner SL: **Alterations in the expression of DEAD-box and other RNA binding proteins during HIV-1 replication.** *Retrovirology* 2004, **1**:42.

38. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK: **Histone deacetylases and cancer: causes and therapies.** *Nat Rev Cancer* 2001, **1**:194-202.
39. Brigati C, Giacca M, Noonan DM, Albini A: **HIV Tat, its TARgets and the control of viral gene expression.** *FEMS Microbiol Lett* 2003, **220**:57-65.
40. Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM: **Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300.** *Cell* 1997, **90**:569-580.
41. El Kharroubi A, Martin MA: **cis-acting sequences located downstream of the human immunodeficiency virus type 1 promoter affect its chromatin structure and transcriptional activity.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**:2958-2966.
42. Battistini A, Marsili G, Sgarbanti M, Ensoli B, Hiscott J: **IRF regulation of HIV-1 long terminal repeat activity.** *J Interferon Cytokine Res* 2002, **22**:27-37.
43. Marsili G, Borsetti A, Sgarbanti M, Remoli AL, Ridolfi B, Stellacci E, Ensoli B, Battistini A: **On the role of interferon regulatory factors in HIV-1 replication.** *Ann N Y Acad Sci* 2003, **1010**:29-42.
44. Sgarbanti M, Marsili G, Remoli AL, Ridolfi B, Stellacci E, Borsetti A, Ensoli B, Battistini A: **Analysis of the signal transduction pathway leading to human immunodeficiency virus-1-induced interferon regulatory factor-1 upregulation.** *Ann N Y Acad Sci* 2004, **1030**:187-195.
45. Emiliani S, Van Lint C, Fischle W, Paras P, Jr., Ott M, Brady J, Verdin E: **A point mutation in the HIV-1 Tat responsive element is associated with postintegration latency.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:6377-6381.

46. Emiliani S, Fischle W, Ott M, Van Lint C, Amella CA, Verdin E: **Mutations in the tat gene are responsible for human immunodeficiency virus type 1 postintegration latency in the U1 cell line.** *J Virol* 1998, **72**:1666-1670.
47. Clouse KA, Powell D, Washington I, Poli G, Strebel K, Farrar W, Barstad P, Kovacs J, Fauci AS, Folks TM: **Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone.** *J Immunol* 1989, **142**:431-438.
48. Perez VL, Rowe T, Justement JS, Butera ST, June CH, Folks TM: **An HIV-1-infected T cell clone defective in IL-2 production and Ca<sup>2+</sup> mobilization after CD3 stimulation.** *J Immunol* 1991, **147**:3145-3148.
49. Folks TM, Justement J, Kinter A, Schnittman S, Orenstein J, Poli G, Fauci AS: **Characterization of a promonocyte clone chronically infected with HIV and inducible by 13-phorbol-12-myristate acetate.** *J Immunol* 1988, **140**:1117-1122.
50. Butera ST, Perez VL, Wu BY, Nabel GJ, Folks TM: **Oscillation of the human immunodeficiency virus surface receptor is regulated by the state of viral activation in a CD4<sup>+</sup> cell model of chronic infection.** *J Virol* 1991, **65**:4645-4653.
51. Hazan U, Thomas D, Alcamì J, Bachelier F, Israël N, Yssel H, Virelizier J-L, Arenzana-Seisdedos F: **Stimulation of human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kappa B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87**:7861-7865.
52. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS: **AIB1, a steroid receptor**

- coactivator amplified in breast and ovarian cancer.** *Science* 1997, **277**:965-968.
53. El Kharroubi A, Verdin E: **Protein-DNA interactions within DNase I-hypersensitive sites located downstream of the HIV-1 promoter.** *J Biol Chem* 1994, **269**:19916-19924.
54. Brussel A, Sonigo P: **Evidence for gene expression by unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA species.** *J Virol* 2004, **78**:11263-11271.
55. Dumonceaux J, Nisole S, Chanel C, Quivet L, Amara A, Baleux F, Briand P, Hazan U: **Spontaneous mutations in the env gene of the human immunodeficiency virus type 1 NDK isolate are associated with a CD4-independent entry phenotype.** *J Virol* 1998, **72**:512-519.

## Figures

### **Figure 1 - Analysis of viral reactivation after treatment of U1 and ACH-2 cells with NaB.**

U1 and ACH-2 cells were treated or not (NT) with 10 mM of NaB for 24 h and cocultured with P4 indicating cells.  $\beta$ -galactosidase activity was determined after 24 h coculture (A). RNA from U1 and ACH2 cells treated or not with NaB were extracted after 24 h and *gag* viral mRNA expression was measured by real-time RT-PCR (B). Results are representative of three independent experiments.

**Figure 2 - Real-time RT-PCR analysis of NCoA3 and IRF8 mRNAs expression in NaB-treated U1 and ACH-2 cells.**

Total RNAs were isolated from U1 or ACH-2 cells treated or not with NaB for 24 h and 48 h and real-time PCR were performed on cDNAs using gene specific primers for *NCoA3*, *IRF8* or *Cyclophilin A*. *NCoA3* and *IRF8* expressions were normalized to the expression of *Cyclophilin A*. The *NCoA3* increase fold (A) in U1 (solid bars) or ACH-2 (hatched bars) cells and the *IRF8* decrease fold (B) in U1 cells treated with NaB for 24 h and 48 h compared to non-treated (NT) cells were determined. Results represent the means of five independent experiments performed in duplicate.

**Figure 3 - Real-time RT-PCR analysis of NCoA3 and IRF8 mRNAs expression in NaB-treated U937 and CEM cells.**

Total RNAs were isolated from U937 or CEM cells treated or not with NaB for 24 h and 48 h and real-time PCR were performed on cDNAs using gene specific primers for *NCoA3*, *IRF8* or *Cyclophilin A*. *NCoA3* and *IRF8* expressions were normalized to the expression of *Cyclophilin A*. The *NCoA3* increase fold (A) in U937 (solid bars) or CEM (hatched bars) cells and the *IRF8* decrease fold (B) in U937 cells treated with NaB for 24 h and 48 h compared to non-treated (NT) cells were determined. Results represent the means of five independent experiments performed in duplicate.

**Figure 4 - Real-time RT-PCR analysis of NCoA3 and IRF8 mRNAs expression in PMA- or TSA-treated U1 and ACH-2 cells.**

Total RNAs were isolated from U1 or ACH-2 cells treated or not with PMA for 24 h and 48 h or TSA for 24 h and real-time PCR were performed on cDNAs using gene specific primers for *NCoA3*, *IRF8* or *Cyclophilin A*. *NCoA3* and *IRF8* expressions

were normalized to the expression of *Cyclophilin A*. The *NCoA3* increase fold (A) in U1 (solid bars) or ACH-2 (hatched bars) cells treated with PMA for 24 h and 48 h and the *IRF8* decrease fold (B) in U1 cells treated with PMA or TSA for 24 h compared to non-treated (NT) cells were determined. Results represent the means of three independent experiments performed in duplicate.

**Figure 5 - Real-time RT-PCR analysis of NCoA3 mRNAs expression in OM10.1 and J1.1 cells.**

Total RNAs were isolated from OM10.1 or J1.1 cells treated or not with NaB for 24 h and 48 h and real-time PCR were performed on cDNAs using gene specific primers for *NCoA3* or *Cyclophilin A*. *NCoA3* expression was normalized to the expression of *Cyclophilin A*. The *NCoA3* increase fold in OM10.1 (solid bars) or J1.1 cells (hatched bars) treated with NaB for 24 h and 48 h compared to non-treated (NT) cells were determined. Results represent the means of two independent experiments performed in duplicate.

**Figure 6 - Western blot analysis of NCoA3 and IRF8 proteins expression.**

Nuclear extract (100 µg) from U1, ACH-2, J1.1 and OM10.1 treated (+) or not (-) with NaB for 24 h were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-NCoA3 or anti-IRF8 antibody, as indicated. The amount of protein was normalized using anti-actin antibody. Results are representative of three independent experiments.

**Figure 7 - NCoA3 increases the Tat-stimulated HIV-1 LTR activity.**

HEK293 cells were cotransfected with pLTRX-luc (10 ng, grey bars) or pLTR $\Delta$ TAR-luc (10 ng, hatched bars) with (+) or without (-) suboptimal amounts of pCMV-Tat (5 ng) and/or pNCoA3 (1  $\mu$ g) expression vectors. NLI (normalized luciferase index) were measured after 24 h and the activation folds compared to the basal activity of the corresponding pLTR-luc were determined. Results represent the means of five independent experiments.

**Figure 8 - IRF8 represses the IRF1-mediated activation of the HIV-1 ISRE element.**

HEK293 cells were cotransfected with pISRE-TK-luc (250 ng, solid bars) or pISREmut-TK-luc (250 ng, hatched bars) with (+) or without (-) pIRF1 (250 ng), pIRF8 (1-2.5  $\mu$ g), or pIRF8-DBD (1  $\mu$ g) expression vectors. NLI (normalized luciferase index) were measured after 24 h and the activation folds compared to the basal activity of the pISRE-TK-luc or pISREmut-TK-luc were determined. Results represent the means of five independent experiments.

## Tables

**Table 1 - Differential gene expression obtained for NCoA3 and IRF8 mRNAs in U1 (A) and ACH-2 (B) cells treated or not with NaB.**

A

Gene	Probe set Name <sup>a</sup>	U1 Signal <sup>b</sup>	U1 Detection p-value <sup>c</sup>	U1NaB Signal	U1NaB Detection p-value	U1NaBvsU1 Signal log <sub>2</sub> ratio <sup>d</sup>	U1NaBvsU1 Change p-value <sup>e</sup>
<i>NCoA3</i>	207700_s_at	17.7	0.01416	98.9	0.000244	2.5	0.000035
	209060_x_at	16.9	0.171387	77.2	0.000244	2.3	0.000023
	209061_at	48.4	0.037598	166.4	0.000732	2.3	0.00002
	209062_x_at	6.3	0.72583	91.8	0.010742	4.5	0.000147
	211352_s_at	7.2	0.303711	68.6	0.00293	3.2	0.000101
<i>IRF8</i>	204057_at	707.9	0.000244	47	0.010742	-4	0.99998

B

Gene	Probe set Name	ACH2 Signal	ACH2 Detection p-value	ACH2NaB Signal	ACH2NaB Detection p-value	ACH2NaBvsACH2 Signal log <sub>2</sub> ratio	ACH2NaBvsACH2 Change p-value
<i>NCoA3</i>	207700_s_at	43.3	0.001953	99.6	0.001221	1.2	0.000241
	209060_x_at	34.5	0.01416	72.9	0.001953	1	0.000273
	209061_at	65.8	0.000732	82.6	0.000732	1.6	0.005409
	209062_x_at	20	0.466064	76.7	0.095215	2	0.000114
	211352_s_at	2.7	0.5	37	0.030273	3.8	0.004481

<sup>a</sup> Affymetrix U133-A reference probe set.

<sup>b</sup> Signal intensity of hybridization.

<sup>c</sup> Signal detection p-value < 0.048 for specific hybridization.

<sup>d</sup> Signal log<sub>2</sub> ratio > 1 for increased genes and < -1 for decreased genes.

<sup>e</sup> Change p-value < 0.0001 for significant increased genes and 1-change p-value > 0.9999 for significant decreased genes.

## **Additional files**

**Additional file 1 – Genes upregulated in U1 and ACH-2 cells.**

**Additional file 2 – Genes specifically upregulated in U1 cells.**

**Additional file 3 – Genes specifically upregulated in ACH-2 cells.**

**Additional file 4 – Genes downregulated in U1 and ACH-2 cells.**

**Additional file 5 – Genes specifically downregulated in U1 cells.**

**Additional file 6 – Genes specifically downregulated in ACH-2 cells.**

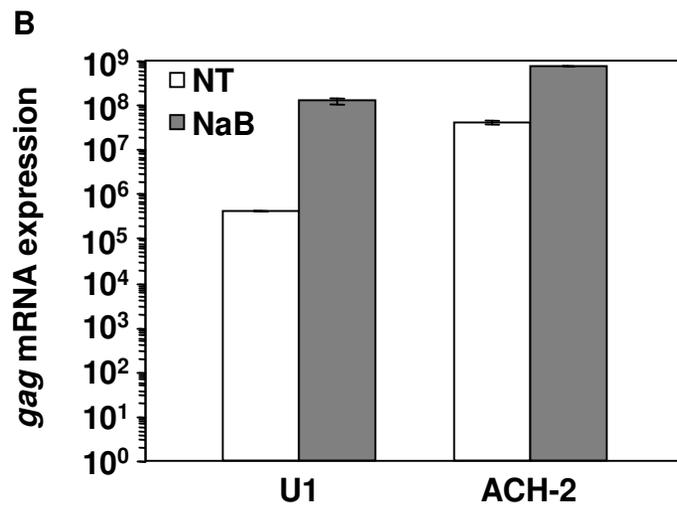
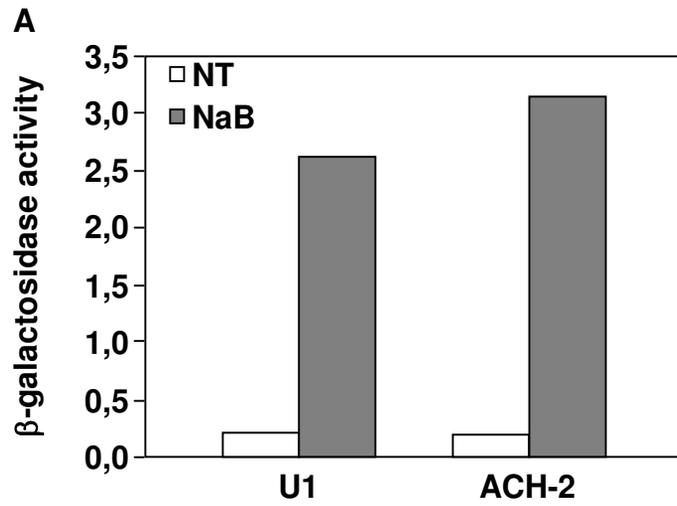


Figure 1

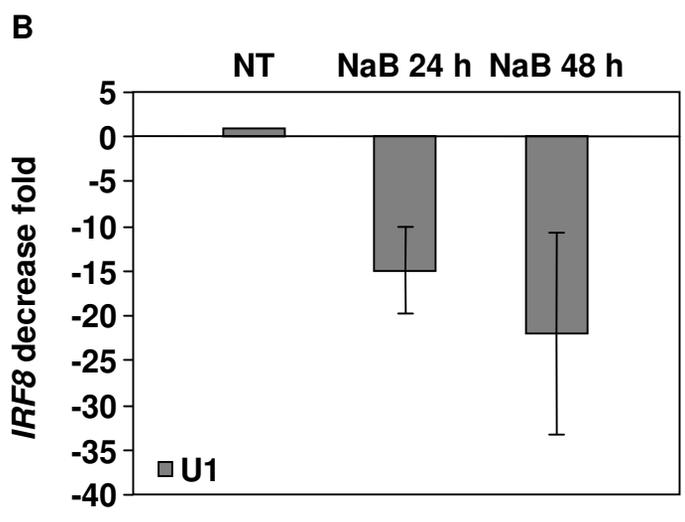
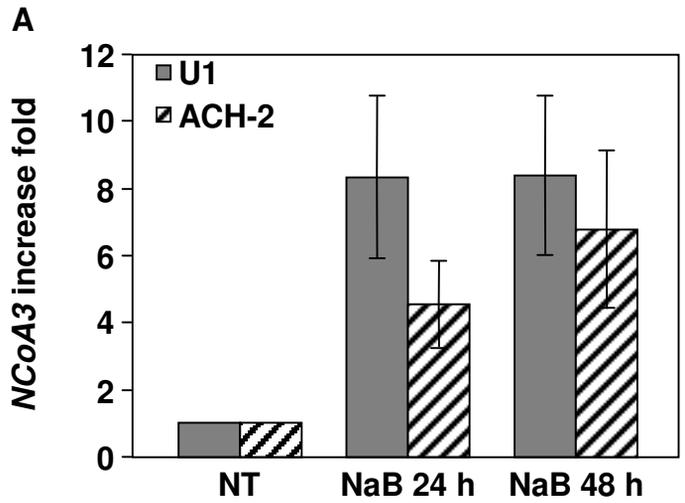


Figure 2

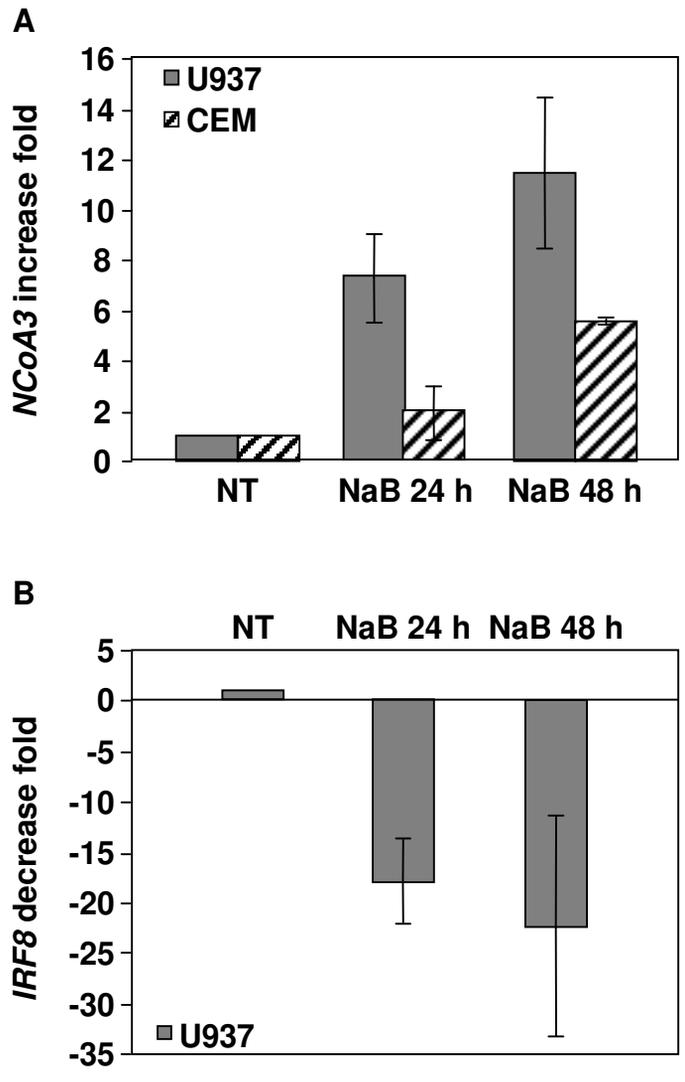


Figure 3

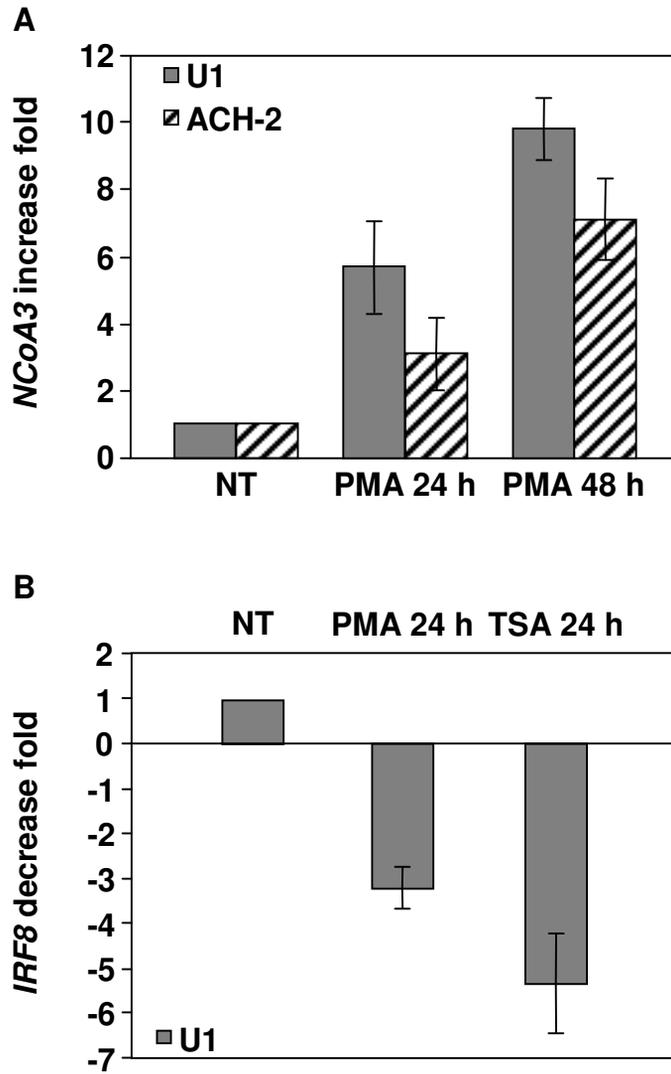


Figure 4

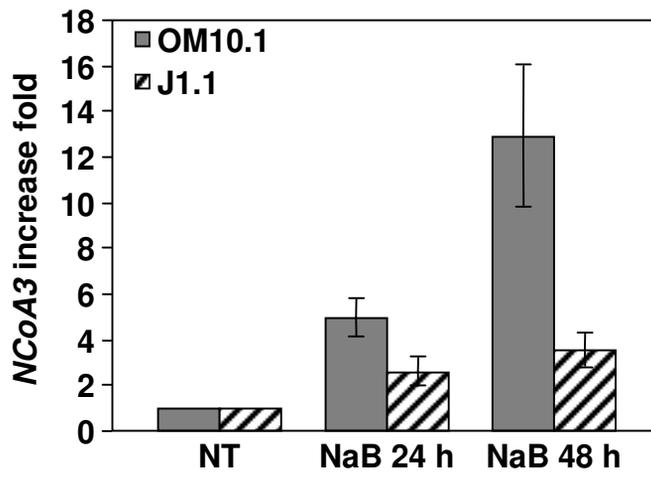


Figure 5

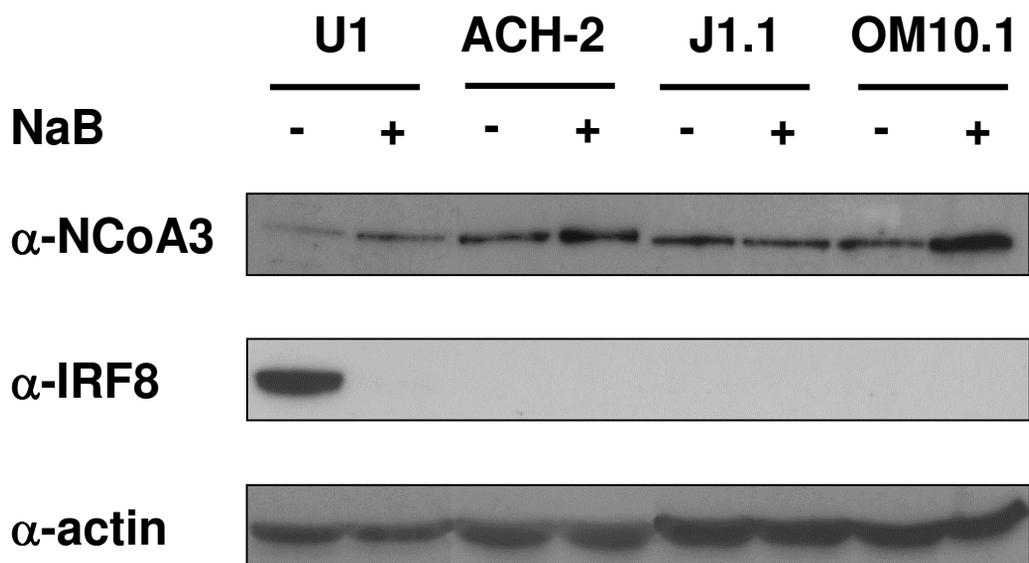


Figure 6

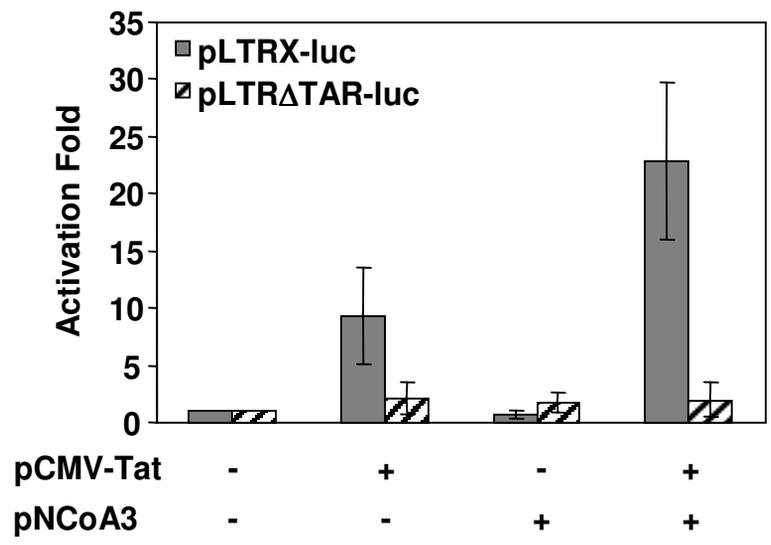


Figure 7

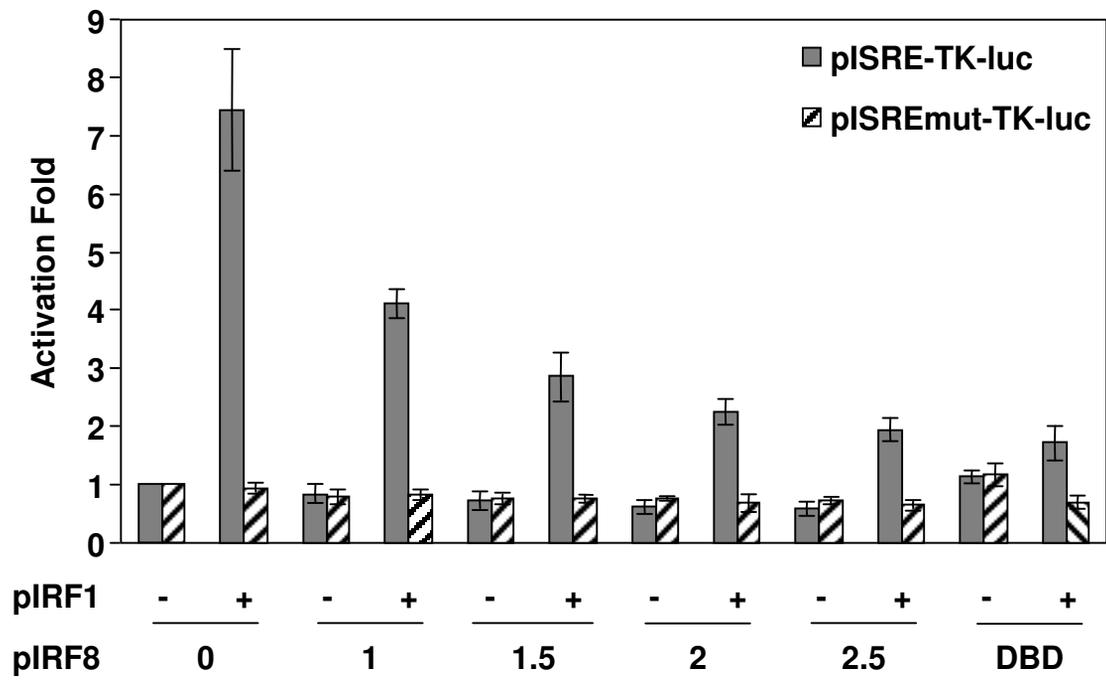


Figure 8

**Additional files provided with this submission:**

Additional file 6 : Add\_file\_6.doc : 73Kb

<http://www.retrovirology.com/imedia/4357784187565256/sup6.DOC>

Additional file 5 : Add\_file\_5.doc : 74Kb

<http://www.retrovirology.com/imedia/7834671347565256/sup5.DOC>

Additional file 4 : Add\_file\_4.doc : 79Kb

<http://www.retrovirology.com/imedia/1222101875756525/sup4.DOC>

Additional file 3 : Add\_file\_3.doc : 73Kb

<http://www.retrovirology.com/imedia/5322512417565255/sup3.DOC>

Additional file 2 : Add\_file\_2.doc : 74Kb

<http://www.retrovirology.com/imedia/1255176331756525/sup2.DOC>

Additional file 1 : Add\_file\_1.doc : 78Kb

<http://www.retrovirology.com/imedia/1868158272756525/sup1.DOC>

## ***RESUME***

L'existence de réservoirs cellulaires du VIH-1 constitue un obstacle majeur à l'éradication de l'infection. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> quiescents constituent le réservoir majeur de latence chez les patients infectés sous trithérapie. Cependant, l'ampleur des réactivations virales observées lors des interruptions de traitement suggère que le VIH-1 persiste dans des réservoirs viraux encore non caractérisés. L'identification de ces réservoirs ainsi que la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien et la réactivation de la latence sont essentiels afin d'élaborer une stratégie efficace pour éliminer le virus des réservoirs cellulaires. Mon travail de thèse a porté d'une part, sur l'étude de l'infection du tissu adipeux par le VIH-1 et son rôle potentiel comme nouveau tissu cible, et d'autre part, sur la recherche de gènes cellulaires candidats impliqués dans le contrôle de la latence du VIH-1.

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si la faible production virale obtenue après infection de préadipocytes par le VIH-1 est due à une faible efficacité d'infection (expression des récepteurs) ou à une faible efficacité de réplication (blocage pré- ou post-intégration). Nous avons infecté des préadipocytes humains primaires par des virus pseudotypés avec des glycoprotéines d'enveloppe de différents tropismes. Aucun blocage de l'entrée ni de la réplication n'est observé avec les virus portant une enveloppe ubiquitaire alors que les virus de tropismes X4 et R5 ne sont pas capables d'infecter ces cellules. En revanche, si les récepteurs sont apportés en *trans*, l'infection des préadipocytes par les virus de tropismes X4 et R5 est restaurée. La co-expression insuffisante des récepteurs viraux à la surface de ces cellules suggère que le tissu adipeux n'est pas une cible privilégiée pour le virus *in vivo* et ne peut donc être considéré comme un nouveau réservoir pour le virus VIH-1.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé le transcriptome différentiel de lignées cellulaires infectées de façon latente par le VIH-1 et stimulées ou non pour la réactivation de la latence par un inhibiteur d'histone déacétylase. Parmi les gènes caractérisés, deux nous ont paru particulièrement intéressants : *NCoA3*, dont l'expression est augmentée, et *IRF8*, dont l'expression est diminuée, après stimulation des cellules infectées de façon latente. Après avoir confirmé les modifications de l'expression de ces gènes au niveau transcriptionnel et traductionnel, nous avons analysé leurs rôles fonctionnels sur la transcription du VIH-1. Notamment, le facteur NCoA3 augmente l'activation de la transcription virale par Tat et le facteur IRF8 inhibe l'activation de la transcription virale par IRF1. Les facteurs NCoA3 et IRF8 pourraient respectivement être impliqués dans la réactivation et le maintien de la latence virale et fournir de nouvelles cibles pour contrôler la réplication virale dans les réservoirs cellulaires *in vivo*.