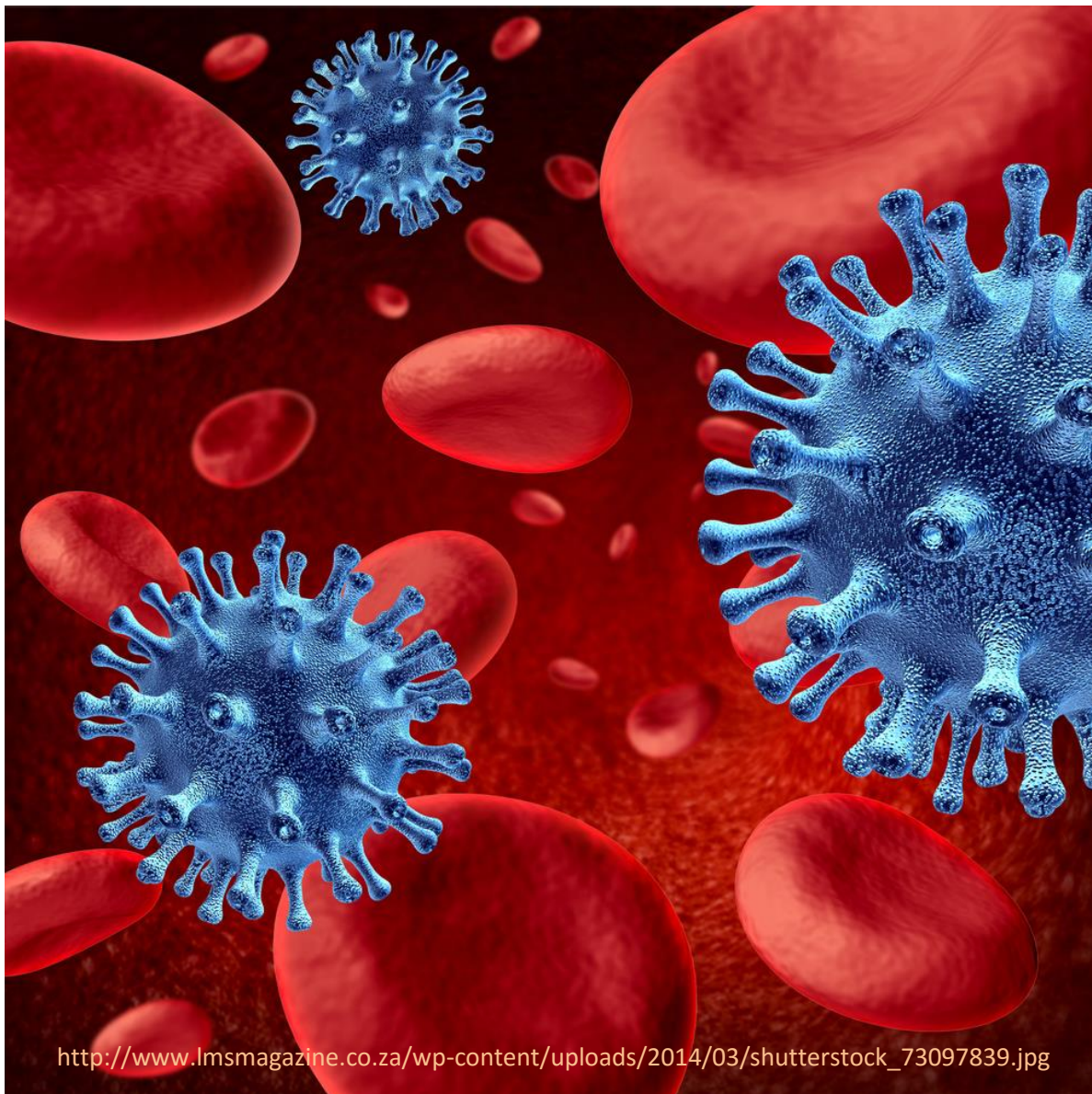


## Travail de Maitrise

Fabian Bovey

### Analyse de biomarqueurs de la latence VIH



Tuteur(s) : Angela Ciuffi (CHUV et UNIL)  
Pascal Meylan (CHUV et UNIL)

## Table des matières

1. Introduction.....	3
1.1 Epidémiologie .....	3
1.2 Réplication du VIH .....	3
1.3 Signification clinique de la latence virale .....	5
1.4 Latence virale .....	5
1.5 Mécanismes moléculaires de la latence virale.....	7
1.6 Stratégies actuelles d'éradication du réservoir.....	9
2. But du travail .....	9
3. Résultats .....	10
3.1 Sélection des candidats .....	10
3.2 Expression des biomarqueurs dans les cellules T CD4 <sup>+</sup> non-infectées.....	12
3.3 Expression protéique des biomarqueurs dans les cellules T CD4 <sup>+</sup> infectées par le VIH.....	16
4. Discussion .....	17
5. Conclusion .....	17
6. Méthodes .....	18
6.1 Protocoles expérimentaux .....	18
7. Bibliographie.....	22
8. Annexes .....	28
8.1 Analyses graphiques des résultats de cytométrie de flux dans les cellules non-infectées.....	28
.....	43
.....	43
.....	44
8.2 Analyses graphiques des résultats de cytométrie de flux dans les cellules infectées. ....	45

# 1. Introduction

## 1.1 Epidémiologie

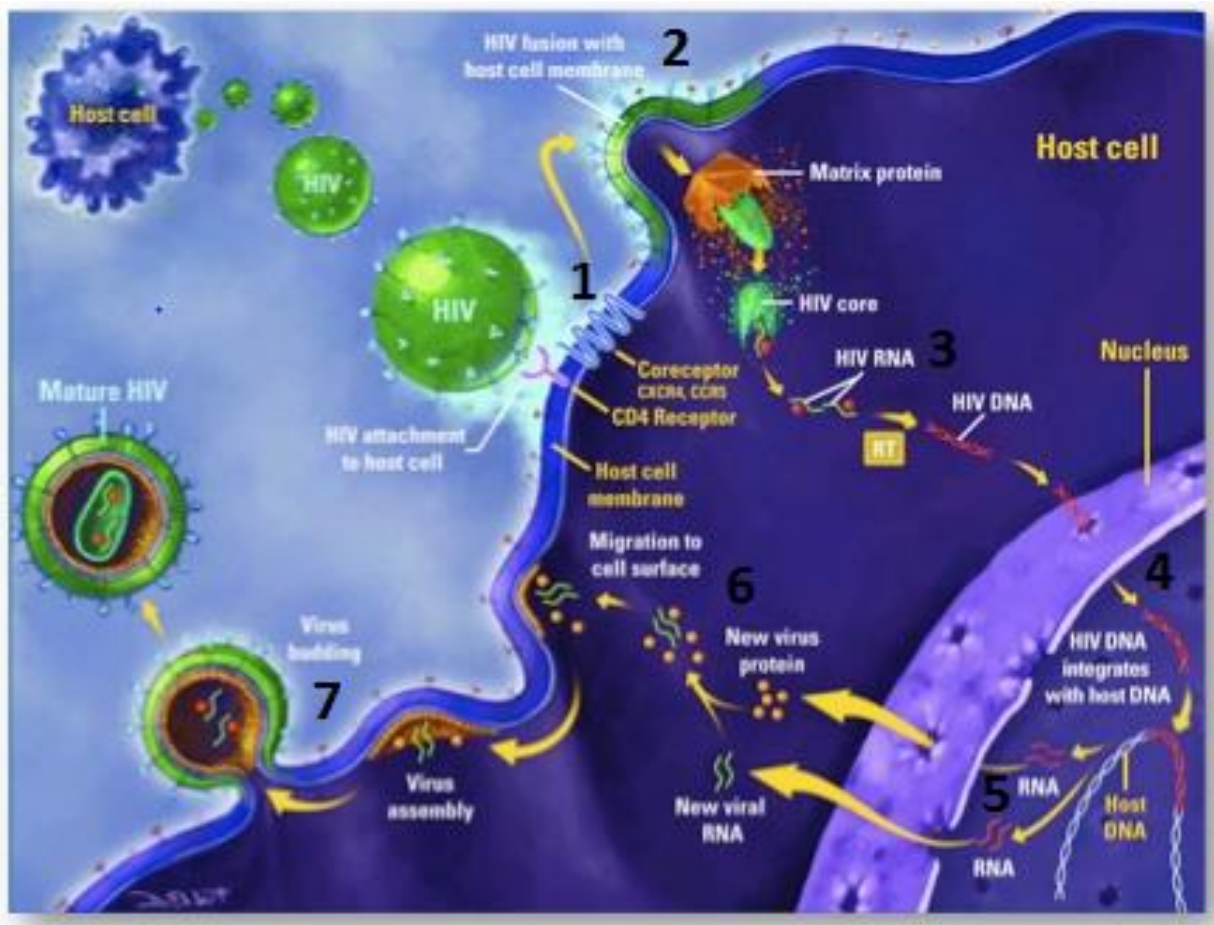
Depuis l'identification du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) en 1981 et par la suite de la découverte du virus qui en est la cause, le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), la recherche médicale n'a cessé d'essayer d'enrayer la pandémie. En 2014, les données épidémiologiques révèlent qu'environ 36,9 millions de personnes sont infectées dans le monde et que 1,2 millions de personnes en décèdent chaque année. L'incidence de nouvelles personnes infectées a notablement chuté depuis 2000 mais se chiffre encore à 2 millions de primo-infections en 2014 (1,2).

Depuis l'arrivée sur le marché de la thérapie antirétrovirale en 1997, un nombre croissant de molécules a été développé avec des mécanismes d'action variés pour arriver actuellement à plus de 20 molécules disponibles qui peuvent être utilisées en combinaison (3). Malgré ceci, en 2015 seulement 15 des 36,9 millions de personnes infectées par le VIH ont efficacement accès à ces médicaments, principalement les malades vivant dans les pays développés (2). De plus, ces médicaments ne guérissent pas de la maladie mais inhibent la réplication virale et empêchent sa propagation. Certaines comorbidités liées à l'infection par le virus, comme une augmentation du risque cardiovasculaire, sont toujours présentes malgré un traitement bien conduit (4,5).

## 1.2 Réplication du VIH

Le cycle viral du VIH est complexe et est constitué de plusieurs étapes importantes qui permettent au virus d'être à la fois infectieux mais aussi de pouvoir échapper au système immunitaire de l'hôte (**Figure 1**). La première étape du cycle consiste en l'entrée du virus dans la cellule hôte qui se fait par l'attachement puis la fusion de la particule virale avec la membrane cellulaire. Dans le cas du VIH, les principales cellules concernées sont les macrophages et les cellules T CD4<sup>+</sup>. L'attachement viral peut se faire à grâce à l'interaction de la protéine de l'enveloppe virale (Env) avec des protéoglycanes chargés négativement à la surface cellulaire, de l'interaction entre Env et l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  voire encore via certains récepteurs tels que le DC-SIGN (6–9). Ces mécanismes permettent le recrutement des particules virales et donc une meilleure infectiosité in vitro de par le rapprochement du VIH de son récepteur membranaire – la molécule CD4 – ainsi que de son corécepteur (10). Alors que les étapes précitées ne sont pas essentielles à l'entrée du virus, la liaison de la glycoprotéine de l'enveloppe virale (Env gp120) à la molécule CD4 est un événement obligatoire à l'entrée du virus (11–14). Une fois la liaison effectuée, un changement de conformation a lieu, permettant la liaison séquentielle de gp120 au corécepteur. Il existe deux corécepteurs utilisés par le virus ; ce sont les molécules CCR5 (principalement) et CXCR4 (15). Un autre changement de conformation permet d'exposer l'autre glycoprotéine de l'enveloppe virale (Env gp41) et d'activer la dernière phase de l'entrée du virus, soit la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire (16,17). Cette dernière permet le relargage de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule hôte, qui contient déjà le matériel nécessaire à l'infection cellulaire, c'est-à-dire du matériel génétique sous forme de 2

brins d'ARN à polarité positive ainsi que deux enzymes très importantes que sont la transcriptase inverse et l'intégrase.



**Figure 1 | Schéma illustratif du cycle de réplication du VIH.** Les étapes clés du cycle de réplication du VIH sont (1) la liaison de gp120 à la molécule CD4 et au corécepteur, (2) la fusion du virus et de la membrane cellulaire, (3) la transcription inverse de l'ARN viral en ADN, (4) l'intégration de l'ADN viral nouvellement formé dans le génome de la cellule hôte, (5) la transcription du matériel génétique du virus, (6) la traduction en protéines virales et finalement (7) l'assemblage des différentes protéines et de matériel génétique sous forme d'ARN pour former une nouvelle particule virale infectieuse. Référence : <http://tcf.epfl.ch/page-6765-en.html>

Une fois le virus présent dans la cellule hôte, l'étape suivante consiste en la transcription inverse de l'ARN viral afin de former un double brin d'ADN. Cette étape requiert la transcriptase inverse, une enzyme spécifique des rétrovirus (18).

L'ADN viral ainsi généré est transporté dans le noyau cellulaire et inséré dans le génome de la cellule hôte. L'intégrase est l'enzyme virale clé de cette étape (19). Une fois le génome viral intégré à celui de la cellule hôte, la transcription virale peut alors commencer. Cette dernière s'effectue grâce à la machinerie cellulaire qui lit les gènes viraux comme ses propres gènes. Le VIH possède différents gènes qui ont chacun leur rôle à jouer. Très tôt après l'infection sont produits des ARNs codant pour les protéines virales régulatrices Tat et Rev puis pour les protéines accessoires Vif, Vpr, Vpu et Nef, et enfin, seulement plus tardivement sont produits d'autres ARNs codants pour les protéines structurales Env et Gag-Pol (20). La transcription virale permet à la fois de fournir le substrat nécessaire à la traduction ribosomique et à la formation des protéines virales, mais également de



fournir la copie de génome viral, aboutissant à l'assemblage et à la production de nouveaux virions prêts à infecter de nouvelles cellules cibles.

### 1.3 Signification clinique de la latence virale

L'existence d'un réservoir viral pour le VIH a des conséquences sur les possibles chances d'éradication du virus de l'organisme (28). Le fait de traiter les patients avec une thérapie antirétrovirale fait chuter la virémie en dessous de la limite de détection des tests de routine standard (limite qui se trouve à 50 copies par ml) mais n'éradique pas la totalité des virus puisque l'utilisation de techniques plus sensibles permet la mise en évidence de ce qu'on appelle la virémie résiduelle qui se situe aux environs de 1-5 copies par ml (60,61). Les molécules antirétrovirales ont pour effet d'empêcher l'infection de nouvelles cellules sensibles à l'infection par le VIH mais n'empêchent pas le relargage de nouveaux virions depuis les cellules déjà infectées (28). La diminution de la virémie après l'initiation d'un traitement antirétroviral peut se diviser en plusieurs phases dépendantes de la mort cellulaire des différentes cellules infectées. La première phase montre une diminution rapide de la virémie et reflète la demi-vie très courte (environ 1 jour) des lymphoblastes T CD4<sup>+</sup> qui sont les cellules qui produisent le plus de particules virales. Ensuite commence la deuxième phase qui dure environ 1-2 semaines et montre une diminution de la virémie plus lente. Elle reflète le déclin d'autres types cellulaires également infectés par le VIH, notamment les macrophages (62). La dernière phase ne présente par contre pas vraiment de diminution dans la virémie et représente en fait cette virémie résiduelle estimée à 1-5 copies par ml. Cette virémie résiduelle a pour origine le réservoir viral. En effet, chaque jour une petite fraction de cellules infectées de manière latente rentre en contact avec un antigène ou avec diverses cytokines et ceci a pour effet d'induire l'activation de ces cellules et donc la production de virions (28,63,64).

La définition du réservoir au VIH est un type cellulaire ou un site anatomique qui permet la persistance de la réplication virale pendant une longue période chez des patients qui suivent un traitement antirétroviral optimal (28). Le principal réservoir est naturellement les cellules T CD4<sup>+</sup> infectées de manière latente mais d'autres cellules font aussi office de réservoir, notamment les cellules issues de la lignée monocyte-macrophage (65,66). Ces cellules semblent être une source importante de virus dans les phases tardives de l'infection quand les cellules CD4<sup>+</sup> ont déjà été fortement décimées mais malgré le fait qu'il est clairement démontré que le VIH peut infecter les monocytes et macrophages, le rôle de ces cellules est bien moins clair. De plus, les monocytes sont des cellules qui traversent la barrière hémato-encéphalique avant de se différencier en microglie et de ce fait, ils constituent un moyen direct au VIH pour pénétrer dans le système nerveux central (67). Finalement il a été décrit récemment que le VIH peut également infecter les cellules hématopoïétiques progénitrices et s'établir de manière latente dans ces dernières, malgré ceci le devenir de ces cellules sous un régime antiviral reste peu clair (68).

### 1.4 Latence virale

La thérapie antirétrovirale consiste en une combinaison de plusieurs médicaments (en général trois au minimum, d'où le terme de trithérapie). Bien qu'efficace, ce traitement ne parvient pas à éliminer le VIH, ce qui se traduit par la réémergence rapide de la virémie (en quelques semaines) lorsque le

traitement est interrompu, et ce quelle que soit la durée du traitement effectuée préalablement (21). Ceci implique l'existence d'un réservoir viral persistant dans l'organisme. Plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer la persistance du virus après l'arrêt d'une thérapie bien conduite de plusieurs années : la première, et celle qui sera discutée plus en détails dans ce papier, est l'existence de cellules quiescentes infectées de manière latente avec des réactivations cellulaires et virales sporadiques (22). La deuxième hypothèse part du principe qu'il existerait des sanctuaires pharmacologiques c'est-à-dire des sites anatomiques où résideraient des cellules infectées et où la thérapie antirétrovirale n'aurait pas accès. Ces deux hypothèses ne s'excluent pas mutuellement et peuvent tout à fait coexister.

La première évidence de l'existence de cellules infectées de manière latente par le VIH vient d'une étude de Folks et al. qui a montré l'induction de l'expression de gènes viraux qui étaient préalablement silencieux dans des cellules infectées (23). En ce qui concerne le VIH, la principale cellule qui abrite le virus de manière latente est la cellule T CD4<sup>+</sup> mémoire centrale (suivie de la cellule T CD4<sup>+</sup> mémoire transitionnelle puis la cellule T CD4<sup>+</sup> mémoire effectrice), en effet le VIH est très peu efficace pour infecter directement les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves, notamment à cause d'une moindre expression des molécules co-réceptrices CCR5 (24,25). D'autres cellules infectées, telles que les macrophages, peuvent participer à ce réservoir latent, mais leur contribution exacte est encore méconnue. L'hypothèse actuelle concernant la façon dont le VIH aboutit à une forme latente dans les cellules mémoires part du principe que le virus profite de la physiologie normale des cellules de l'immunité adaptative, c'est-à-dire que face aux antigènes viraux, les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves sont activées, prolifèrent de manière importante et se différencient en cellules effectrices (26,27). Elles sont alors très susceptibles à l'infection par le VIH. Rapidement la majorité des cellules effectrices meurent par l'effet cytopathique du virus ou fait de la réponse du système immunitaire face aux cellules infectées. Néanmoins certaines de ces cellules effectrices retournent en phase G<sub>0</sub> en tant que cellules mémoires quiescentes.

L'expression génique du VIH dépend de facteurs de transcription de la cellule hôte et de ce fait, lorsque la cellule évolue en cellule mémoire quiescente, avec un schéma d'expression génique fortement réduit, l'expression génique du VIH s'éteint également (28). Le virus se trouve alors sous une forme dormante, c'est-à-dire transcriptionnellement inactive. Par la suite d'autres mécanismes interviennent dans la mise en place et le maintien de la latence (voir suite). Sous sa forme latente, le virus persiste uniquement sous forme d'information génétique intégrée à l'ADN de l'hôte et se retrouve protégé des molécules antivirales ainsi que du système immunitaire. Par contre si la cellule contenant le virus se réactive (par contact avec un antigène ou par le truchement de molécules activatrices), la cellule peut se mettre à produire à nouveau du virus, favorisant ainsi un rebond de virémie.

En résumé, la persistance d'un réservoir viral latent est possible (i) grâce à la propriété du VIH d'intégrer son génome dans celui de la cellule hôte et donc d'être associé à vie avec la cellule infectée, et (ii) grâce à la grande longévité des cellules mémoires quiescentes, dont la demi-vie a été estimée en moyenne à 44 mois (29).

## 1.5 Mécanismes moléculaires de la latence virale

Les mécanismes qui régissent la latence virale sont multiples, complexes et ne sont pas tous élucidés à ce jour. Parmi les mécanismes impliqués dans la mise en place de la latence virale, on peut noter le rôle important de changements épigénétiques au niveau de la chromatine qui rendent silencieuse l'expression génique du virus (28). Comme pour tous les autres promoteurs, il est important d'avoir la présence de facteurs de transcription afin d'activer la machinerie transcriptionnelle. Or plusieurs changements épigénétiques peuvent convertir l'euchromatine en hétérochromatine et de ce fait empêcher les facteurs de transcription d'accéder au promoteur. Bien que plusieurs provirus VIH furent identifiés comme étant intégrés dans des régions d'hétérochromatine, il ne s'agit pas de la majorité des provirus puisque la plupart du temps, le VIH s'intègre dans des gènes cellulaires qui sont fortement transcrits par les cellules T CD4<sup>+</sup>, ce qui suggère que d'autres mécanismes sont nécessaires pour expliquer complètement la latence virale (30,31). D'autres mécanismes agissant au niveau post-transcriptionnel, tel que lors de l'export nucléaire des ARN messagers ou lors de la traduction, peuvent également contribuer à l'absence de production de particules virales et donc dans une certaine mesure à la persistance d'un réservoir viral latent.

Pour rester dans les mécanismes épigénétiques impliqués dans la latence, d'autres hypothèses viennent cette fois des nucléosomes. Les nucléosomes sont l'unité structurale de la chromatine et sont formés de 147 paires de bases d'ADN enroulées autour de molécules d'histones (histones H2A, H2B, H3 et H4) (32). Entre 2 nucléosomes consécutifs se trouvent environ 80 nucléotides libres qui sont liés par des molécules d'histone H1. Les molécules d'histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles telles que des acétylations, méthylation, ubiquitination, phosphorylation, sumoylation et polyADP-ribosylation (33). Ces modifications des molécules d'histones influencent l'expression génique (34). En ce qui concerne le VIH, deux nucléosomes appelés nuc-0 et nuc-1 sont positionnés à proximité du site d'initiation de la transcription dans le LTR 5' du provirus VIH, régulant ainsi l'activité transcriptionnelle du promoteur LTR (35). La formation de nuc-1 dépend fortement de l'état d'acétylation des histones, en effet la présence d'enzymes appelées déacétylases d'histones enlèvent le groupe acétyle des histones, rendant alors le promoteur silencieux (36). Plusieurs études ont montré qu'une de ces enzymes est effectivement recrutée au niveau du LTR du provirus à l'aide d'interactions avec d'autres molécules liées sur le LTR telles que la sous-unité p50 de NF- $\kappa$ B ou encore le récepteur aux hormones thyroïdiennes (37–39). Malheureusement l'administration d'acide valproïque, un inhibiteur des déacétylases d'histones, ne semble pas produire un effet majeur sur le réservoir viral (40,41). Par contre l'utilisation d'un autre inhibiteur des déacétylases d'histones, appelé vorinostat (ou SAHA), semble avoir fait ses preuves sur sa capacité de réactiver la transcription du virus mais néanmoins sans avoir un effet majeur sur le réservoir viral, probablement à cause de blocages post-transcriptionnels (42,43).

La méthylation de l'ADN semble être également un autre mécanisme qui renforce la latence virale (28). Le site d'initiation de la transcription au niveau du génome du VIH comprend deux îlots CpG qui sont méthylés et qui contribuent à la latence virale en empêchant les facteurs de transcription d'accéder au promoteur (44). Plusieurs études sont en cours afin d'identifier des inhibiteurs d'ADN méthyltransférase et de caractériser leurs effets sur la latence virale.

Comme mentionné plus haut, le provirus s'intègre le plus souvent à l'intérieur de gènes hôtes qui sont fortement transcrits (45). La raison évoquée pour expliquer le fait que le provirus reste latent réside dans ce qu'on appelle l'interférence transcriptionnelle. Il en existe plusieurs formes en fonction de l'orientation du provirus par rapport au gène dans lequel il est intégré (46). Si le provirus ainsi que le gène hôte présentent la même polarité, il y aura mise en place d'un phénomène de compétition entre le promoteur viral et le promoteur du gène hôte (47). De plus les facteurs de transcription seront également en compétition entre les 2 promoteurs, les 2 mécanismes contribuant à la latence. Si par contre le provirus s'est intégré dans le sens contraire, les deux promoteurs se feront face et il en résultera une diminution de l'activité de ces derniers (due à la collision des complexes d'ARN polymérase), ce qui a aussi des effets sur la latence virale.

L'expression génique du VIH est fortement dépendante de plusieurs facteurs de transcription de la cellule hôte qui sont induits par des stimuli extracellulaires (notamment l'activation du récepteur des cellules T ou encore suite à l'effet de cytokines diverses) (48). Parmi ces facteurs de transcription on peut mentionner NF- $\kappa$ B, NFAT, Sp1 et AP-1. Dans les cellules au repos, NF- $\kappa$ B et NFAT sont séquestrés dans le cytoplasme et de ce fait ne peuvent pas promouvoir l'activation des provirus VIH. Les facteurs de transcription de la famille de NF- $\kappa$ B peuvent exercer un rôle activateur mais aussi inhibiteur sur le promoteur viral (28). L'acétylation de la sous-unité RelA de NF- $\kappa$ B par p300/CBP régule aussi l'activation du provirus (49). En effet, cela régule la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN, son assemblage avec I $\kappa$ B $\alpha$  ainsi que son activité transcriptionnelle (50,51). L'acétylation de RelA est supprimée par l'action de deux déacétylases que sont HDAC3 et SIRT1 (50,52). Il est intéressant à noter que l'activité déacétylase de SIRT1 sur RelA sur sa lysine 310 est bloquée par la protéine virale Tat (53). L'acétylation de cette lysine de RelA augmente l'activité transcriptionnelle et de ce fait, cet effet inhibiteur de Tat pourrait décupler l'action de NF- $\kappa$ B et augmenter l'expression de gènes viraux, de gènes importants dans la réponse inflammatoire et dans l'activation immunitaire. La déacétylation de la lysine en position 221 par la déacétylase HDAC3 permet aux nouvelles molécules I $\kappa$ B $\alpha$  de lier RelA ce qui le renvoie en dehors du noyau cellulaire et donc termine son activité transcriptionnelle (54). L'état d'acétylation ou de déacétylation de RelA permet donc de déterminer la durée et la force de la réponse transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B et, *in fine*, de l'activation de ses gènes cibles (y compris les provirus intégrés). Plusieurs agents ont été imaginés comme étant utiles pour purger le réservoir viral parce qu'ils peuvent induire la voie de NF- $\kappa$ B mais malheureusement ce facteur de transcription est une molécule tellement ubiquitaire et massivement impliquée dans énormément de transcriptions géniques que l'utilisation de telles molécules ne serait pas sans conséquences adverses.

La transcription du VIH peut être grossièrement divisée en deux phases : la première phase est une phase précoce dans laquelle l'expression génique est faible mais permet la production de la protéine virale Tat qui intervient dans la deuxième phase où elle induit une forte transcription virale (55). De par cette observation, l'absence relative de Tat pourrait expliquer la latence virale (56). La protéine Tat agit via sa liaison à TAR (pour *transactivation-responsive element* en anglais) qui est un bout d'ARN situé à l'extrémité 5' des transcrits viraux naissants (28). Le complexe Tat-TAR ainsi formé va se lier à une kinase appelée P-TEFb qui va phosphoryler à la fois l'ARN Polymerase II et Spt5 (qui est un facteur qui permet une transcription avec un meilleur rendement) (57,58). La présence de Tat permet donc une production, et surtout une élongation, d'ARN efficace. En effet, en l'absence de Tat, la transcription par l'ARN Polymérase II est perturbée par deux facteurs appelés NELF et DSIF (pour *negative elongation factor* et *DRB sensitivity-inducing factor* en anglais) qui ne permettent pas de produire des transcrits de taille convenable (28). A ce niveau intervient à nouveau la kinase P-TEFb



qui va phosphoryler NELF qui, avec l'aide de TFIIH/CDK7, va éliminer ces 2 facteurs et permettre la transcription (59). De par ce qui a été mentionné plus haut, on comprend que Tat a fortement besoin de la kinase dépendante des cyclines P-TEFb. Cette kinase est normalement liée à un complexe ribonucléoprotéique composé d'ARN 7SK et de HEXIM-1 ou HEXIM-2 (28). La protéine Tat libère la kinase de ce complexe afin de l'utiliser pour activer efficacement la transcription du provirus.

## 1.6 Stratégies actuelles d'éradication du réservoir

Aux vues de tout ceci, il devient clair que pour tenter d'éradiquer le VIH et de pouvoir soigner les patients infectés, il est indispensable de s'attaquer au réservoir viral et de multiples recherches ont été faites sur le sujet. Il a été montré que l'intensification de la trithérapie en ajoutant un quatrième inhibiteur n'affecte en rien la virémie résiduelle ni ne diminue le réservoir (69–72). Les efforts se concentrent maintenant pour trouver un moyen de réactiver le réservoir viral chez les patients qui suivent un traitement antirétroviral. L'hypothèse est que les cellules infectées dont la latence est contrecarrée et donc qui produisent à nouveau des protéines virales sont des cellules qui vont mourir soit par l'effet cytopathique du virus soit par l'action des cellules T CD8<sup>+</sup> et de plus, les virions relâchés par ces cellules seront incapables d'infecter de nouvelles cellules grâce à la trithérapie (28). Cette approche a été appelée la stratégie « shock and kill » (73). De multiples molécules ont été testées dans le but de réactiver ces cellules, notamment la cytokine IL-2 ainsi que des anticorps anti-CD3 mais malheureusement les deux molécules se sont révélées inefficaces et même dangereuses car elles activent les cellules T de manière non-spécifique, ce qui entraîne une grosse réaction inflammatoire (74,75). Les regards sont surtout tournés vers des agonistes de la protéine kinase C ou encore des inhibiteurs des déacétylases d'histones. Les agonistes de la protéine kinase C, comme la prostratine, activent la voie de la kinase et activent NF-κB, NFAT et AP-1 qui sont importants pour la réactivation virale (76). Ces agonistes semblent être capables d'activer l'expression du VIH en plus d'avoir la capacité de diminuer la quantité de molécules CD4 et CXCR4 à la surface cellulaire, ce qui peut être protecteur contre l'infection de nouvelles cellules (77,78). Récemment, une étude a démontré que l'activation transcriptionnelle ainsi que la traduction protéique du VIH était possible en utilisant l'effet synergique des agonistes de la protéine kinase C ainsi que des molécules capables de relâcher P-TEFb de son complexe (79). Le disulfiram est une autre molécule utilisée dans le but de réactiver les cellules en latence. Il agit en activant la voie de Akt sans induire une activation globale des cellules T (80,81). La recherche est concentrée sur ces molécules afin de pouvoir trouver, *in fine*, une manière adéquate de réactiver le réservoir.

## 2. But du travail

La découverte d'un ou de plusieurs biomarqueurs de latence VIH pourrait représenter une avancée majeure dans l'espoir de trouver un traitement éradicateur du VIH. En effet, un biomarqueur pourrait être utilisé de plusieurs manières. Si le biomarqueur s'avère être une protéine de surface fortement surexprimée sur les cellules infectées de manière latente, l'étape suivante serait d'imaginer produire des anticorps contre cette molécule afin de neutraliser ces cellules, c'est-à-dire

avoir un effet direct sur les cellules abritant le virus de manière latente. Si par contre le biomarqueur n'est pas une protéine de surface mais une protéine intracellulaire ou une protéine sécrétée par la cellule hôte et qu'elle est également surexprimée dans les cellules abritant le virus latent, une action directe sur les cellules est peu probable mais le biomarqueur pourrait être un outil utile dans la détermination plus précise de la taille du réservoir, de se faire une idée de sa cinétique et de sa réponse à divers traitements.

Cette étude se base sur une première étude faite en 2014 dans laquelle a été effectuée une analyse extensive des transcrits ARN produits dans une cellule infectée par le VIH lors de sa phase d'entrée en latence, de sa phase de latence à proprement parler et lors de sa phase de réactivation (43). En utilisant le modèle de cellules primaires de Cloyd et Karn (82), une comparaison du transcriptome (réalisée par RNA-Seq) entre des cellules infectées par le VIH et des cellules non-infectées par ce dernier a été faite et a permis de mettre en évidence 103 gènes cellulaires qui étaient surexprimés dans les cellules infectées de manière latente par rapport aux cellules contrôles non infectées (43). De la même manière, 124 gènes furent mis en évidence comme étant sous-exprimés dans les cellules infectées de manière latente par rapport aux cellules contrôles. Ces gènes différenciellement exprimés entre les cellules non infectées et les cellules infectées de manière latente représentent donc des biomarqueurs potentiels de la latence VIH.

Le but de cette étude est d'évaluer l'expression protéique de 8 gènes dont les transcrits étaient surexprimés dans les cellules en latence et l'expression protéique de 5 gènes dont les transcrits étaient sous-exprimés dans ces mêmes cellules, et de confirmer si cette expression varie entre des cellules infectées de manière latente et des cellules non-infectées.

### 3. Résultats

#### 3.1 Sélection des candidats

L'étude du transcriptome de cellules non-infectées et de cellules infectées de manière latente (publiée en 2014 par Mohammadi et al. et dont les résultats sont également disponibles en détails sur <http://litchi.labtelenti.org>) a permis d'identifier des gènes dont les transcrits sont différenciellement exprimés entre ces cellules, faisant d'eux des biomarqueurs potentiels de latence VIH.

De la totalité des gènes sous-exprimés et surexprimés dans cette étude, nous en avons retenu 13 pour mener à bien cette étude. Ces gènes sont listés dans le **Tableau 1** et le **Tableau 2** ci-dessous. Le premier critère de sélection était avant tout le nombre de « reads » détectés pour chaque gène car il semblait logique de cibler un gène fortement exprimé plutôt qu'un gène à expression faible étant donné que le but ultime est de l'utiliser en tant que biomarqueur. Le deuxième critère important de sélection était le taux de différence d'expression du gène (fold change) entre les cellules non-infectées (appelées cellules « mock ») et les cellules infectées en latence. Ceci est logique puisque notre hypothèse du biomarqueur se base sur le fait que la protéine recherchée doit être exprimée de façon différentielle entre les cellules infectées de manière latente et les non-infectées afin d'être plus spécifique. Finalement le dernier critère de sélection se basait sur l'existence et la disponibilité d'anticorps contre le produit des différents gènes.

**Tableau 1** Liste des gènes sous-exprimés dans les cellules en latence

Nom	ID gène <sup>1</sup>	Log2 Fold Change <sup>2</sup>	"Reads" mock <sup>3</sup>	"Reads" VIH <sup>4</sup>
<b>CCL5</b>	6352	2.4375262	22570	3668
<b>CXCR4</b>	7852	1.0108101	5121	2528
<b>GNLY</b>	10578	5.1413774	4348	82
<b>PYHIN1</b>	149628	1.0262465	1108	537
<b>FOXP3</b>	50943	1.3725576	554	212

Gènes sous exprimés dans les cellules en latence avec (1) leur numéro d'identification (ID), (2) le taux de changement entre mock et HIV (exprimé en log2) ainsi que le nombre de « reads » pour les cellules mock (en bleu) (3) et les cellules infectées de manière latente (en rouge) (4).

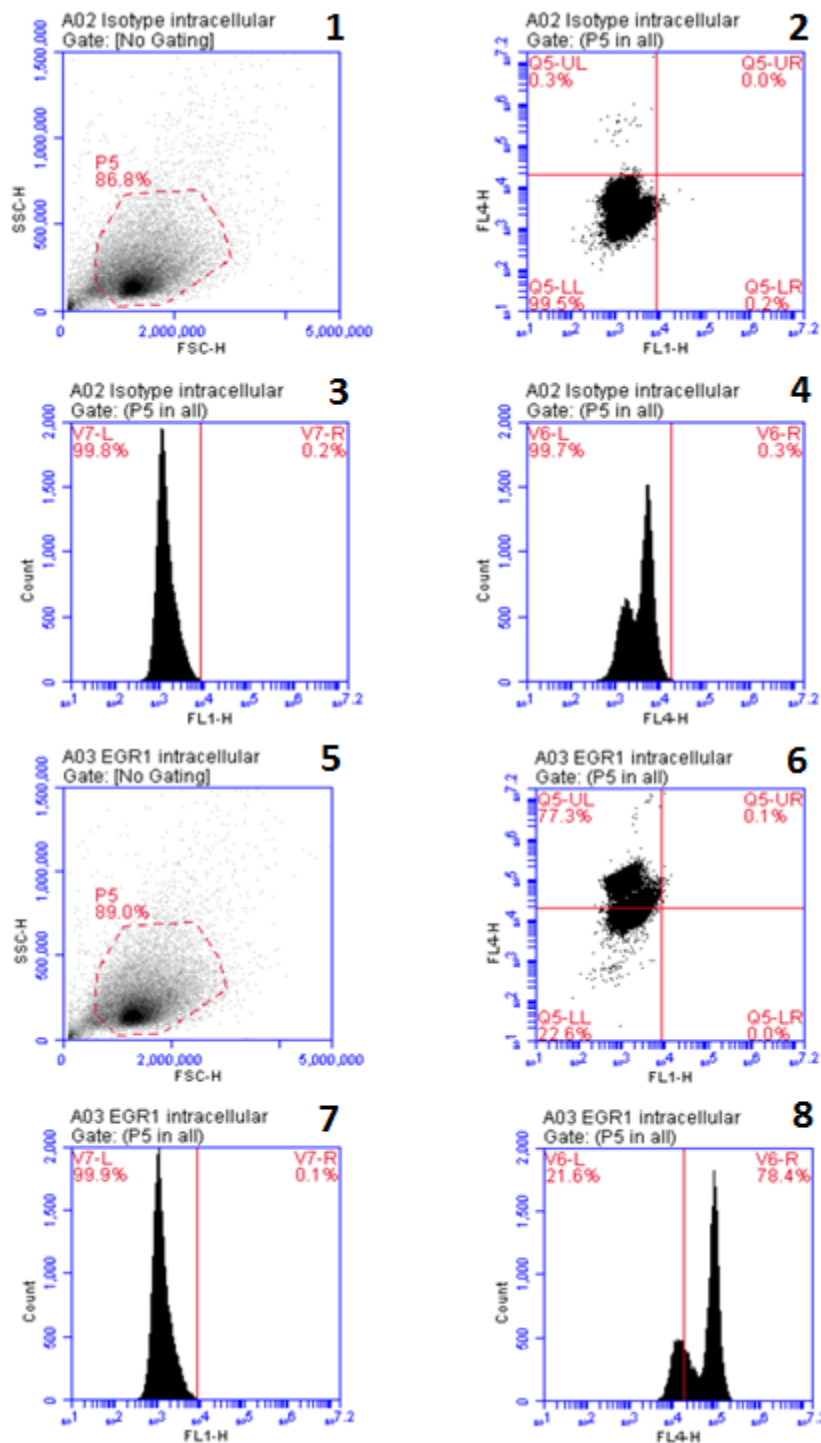
**Tableau 2** | Liste des gènes sur-exprimés dans les cellules en latence.

Nom	ID gène <sup>1</sup>	Log2 Fold Change <sup>2</sup>	"Reads" Mock <sup>3</sup>	"Reads" VIH <sup>4</sup>
<b>EGR1</b>	1958	-1.0321724	25458	52885
<b>JUNB</b>	3726	-1.0050739	11918	23974
<b>DUSP2</b>	1844	-1.4232215	7573	20919
<b>TCF7</b>	6932	-1.6351388	978	3048
<b>BZRAP1</b>	9256	-1.6969994	411	1308
<b>C1orf162</b>	128346	-1.4127945	356	950
<b>COLQ</b>	8292	-1.3345019	370	867
<b>ALS2CL</b>	259173	-1.3382692	239	583

Gènes sur-exprimés dans les cellules en latence avec (1) leur numéro d'identification (ID), (2) le taux de changement entre mock et HIV (exprimé en log2) ainsi que le nombre de « reads » pour les cellules mock (en bleu) (3) et les cellules infectées de manière latente (en rouge) (4).

### 3.2 Expression des biomarqueurs dans les cellules T CD4<sup>+</sup> non-infectées

Ce travail s'est effectué en deux parties consistant d'abord en l'analyse de l'expression protéique des biomarqueurs potentiels dans des cellules T CD4<sup>+</sup> non-infectées afin d'évaluer la qualité de la détection et secondairement l'analyse de ces mêmes protéines dans des cellules T CD4<sup>+</sup> activées puis infectées par spinoculation par un virus modifié (voir méthodes).



**Figure 2| Proportion de cellules exprimant les biomarqueurs de la latence VIH.** Analyse par cytométrie de flux de la proportion des cellules exprimant les biomarqueurs en utilisant EGR1 comme exemple. Les quatre panneaux du haut correspondent à l'analyse de l'isotype alors que les quatre du bas représentent l'analyse de l'anticorps anti-EGR1 spécifique. Le panneau 1 représente la population totale de cellules détectées par la cytométrie de flux dans l'échantillon contenant l'isotype, le panneau 2 nous permet d'évaluer l'expression de FL1 et FL4 des cellules sélectionnées dans le panneau 1 (gating). Le panneau 3 montre ces mêmes cellules sélectionnées avec leur expression uniquement de FL1 et le panneau 4 est le même mais pour le marqueur FL4. Les panneaux 5, 6, 7 et 8 sont les mêmes mais cette fois-ci pour des cellules marquées par un anticorps anti-EGR1 spécifique.

Afin d'évaluer le niveau d'expression protéique des cellules T CD4<sup>+</sup> non-infectées, une analyse par cytométrie de flux des différentes protéines a été effectuée en utilisant soit un anticorps directement couplé à une molécule fluorescente soit en utilisant d'abord un anticorps primaire non couplé qui est ensuite reconnu par un anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente. Une fois le marquage effectué, les différentes protéines ont été analysées séparément afin de se faire une idée de l'expression basale de ces protéines chez des cellules T CD4<sup>+</sup> non-infectées par le VIH. Les protocoles pour les protéines de surface, les protéines intracellulaires et les protéines destinées à être sécrétées sont différents et ont été effectués en parallèle (voir « méthodes »).

Chaque protéine est comparée à un contrôle (appelé « isotype ») qui est en fait un anticorps non-spécifique de la même famille que l'anticorps ciblé contre la protéine analysée. Le but de cet isotype est de nous donner une idée du bruit de fond (signal basal non spécifique) et permet une comparaison avec l'anticorps spécifique (signal spécifique) afin de s'assurer de la qualité de la détection de l'expression protéique. Si aucune différence de signal n'est détectable entre l'isotype et l'anticorps spécifique, cela indique que la protéine n'est pas exprimée par la cellule.

Une première comparaison peut être faite en utilisant directement les analyses graphiques issues de la cytométrie de flux et en analysant les pourcentages d'événements positifs pour le marqueur dans les échantillons avec anticorps spécifique par rapport à l'isotype. La **Figure 2** montre un exemple avec la protéine EGR1 où l'on voit bien que, comparé à l'isotype, les cellules expriment bien la protéine dans les échantillons avec l'anticorps spécifique anti-EGR1 (>77% des cellules expriment EGR1 à un niveau supérieur que l'isotype). Les autres analyses graphiques effectuées sont disponibles en annexe (annexe 8.1).

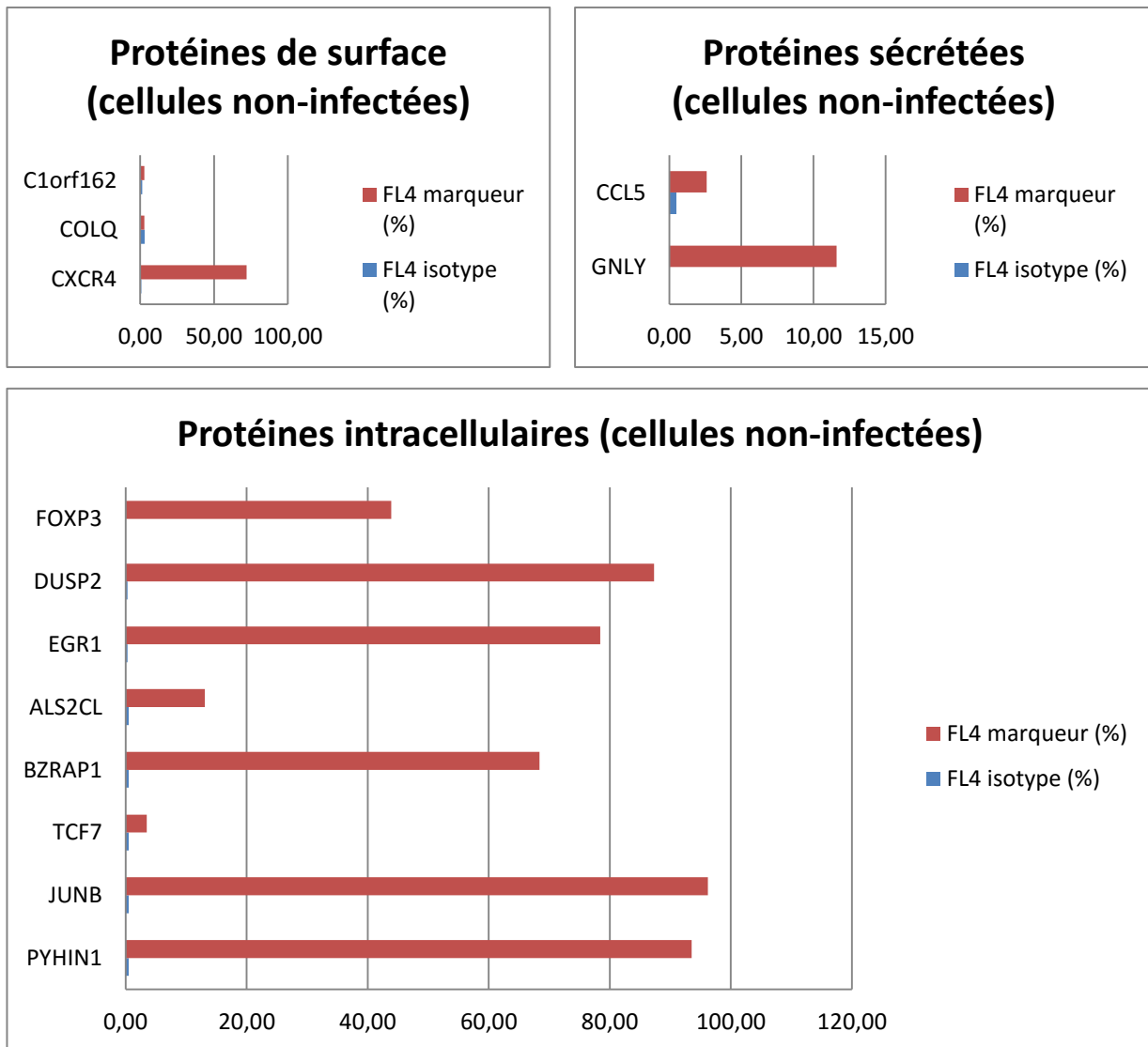
Ces proportions cellulaires exprimant les protéines spécifiques peuvent être représentés sur un graphique (**Figure 3**). Cette analyse révèle que la majorité des protéines est exprimée dans les cellules T CD4<sup>+</sup> non infectées (proportion supérieure à celle de l'isotype) hormis certaines qui sont peu présentes voire absentes telles que C1orf162, COLQ ou encore TCF7.

Une comparaison plus objective de l'expression protéique pourrait être faite en utilisant non pas les proportions (%) mais en utilisant le paramètre de l'intensité moyenne de fluorescence (*Mean Fluorescent Intensity*, MFI) qui est donné également par l'appareil de cytométrie et qui reflète le niveau d'expression globale de la quantité de protéines (**Figure 4**).

Si l'on compare les deux types d'analyses, à savoir les proportions (%) et les MFI, on remarque la présence de discrédances relativement importantes, notamment avec CXCR4 et FOXP3 où l'analyse de leur MFI indique une faible expression protéique alors que l'analyse des proportions montre une proportion plus importante d'événements positifs que de liaisons non-spécifiques (de l'isotype). Néanmoins, l'analyse de la MFI semble être une approche plus objective puisqu'elle prend l'ensemble des événements et pas seulement ceux au-delà d'un seuil défini arbitrairement.

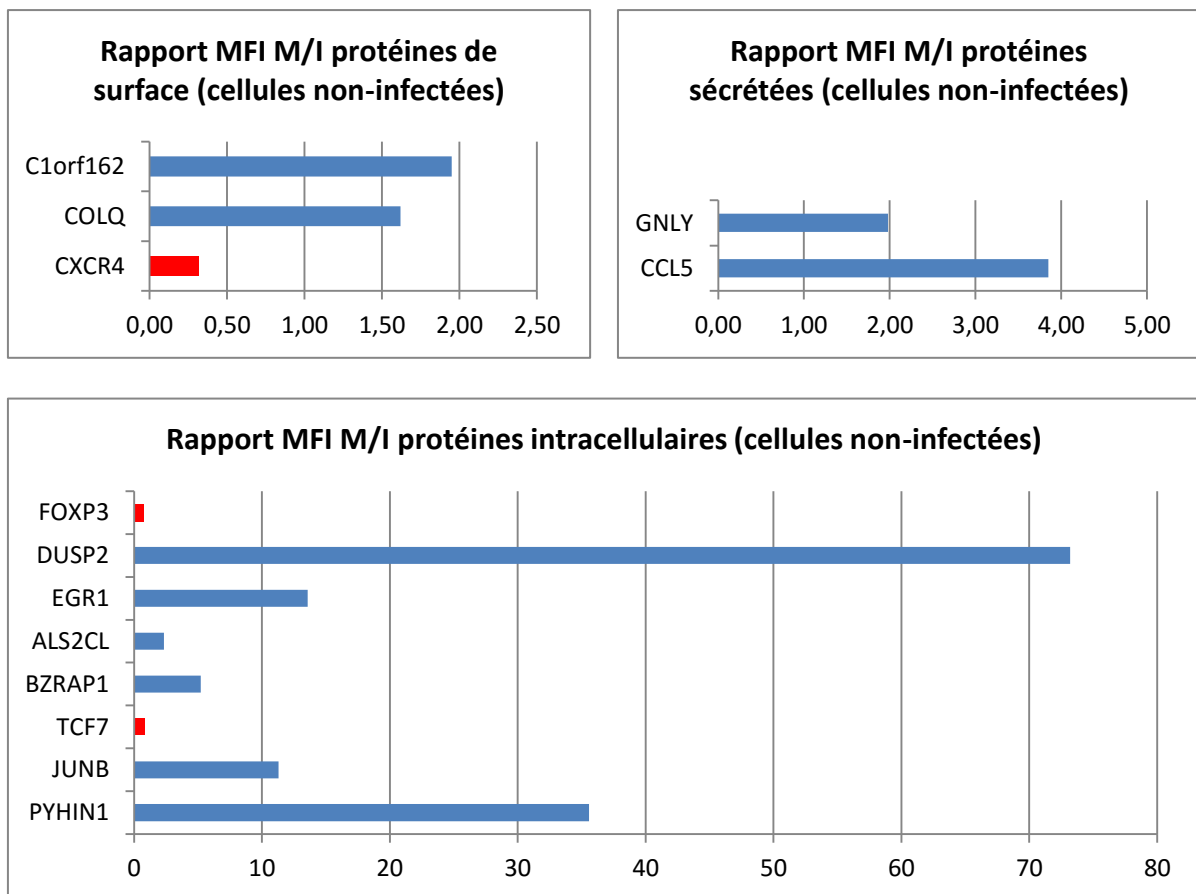
Il est également intéressant de comparer les « reads » identifiés dans l'étude de Mohammadi et al. avec les résultats obtenus par cytométrie de flux. Pour ce qui est des protéines de surface, la protéine CXCR4 est la seule à avoir une expression faible en analyse FACS alors que dans l'étude susmentionnée il s'agit de la protéine de surface avec le taux de « reads » le plus élevé, ce qui suggère que l'ARN ne semble que très peu traduit en protéines.





**Figure 3 | Proportion des cellules exprimant les biomarqueurs candidats dans les cellules non-infectées.** Les marquages sont séparés selon la localisation cellulaire des protéines, c'est-à-dire une localisation à la surface (panneau en haut à gauche), sécrétée (panneau du haut à droite) ou intracellulaire (panneau du bas). La proportion de cellules (%) exprimant le biomarqueur est représentée en rouge alors que la proportion du nombre de cellules marquées par l'isotype au-dessus du seuil choisi est indiqué en bleu.

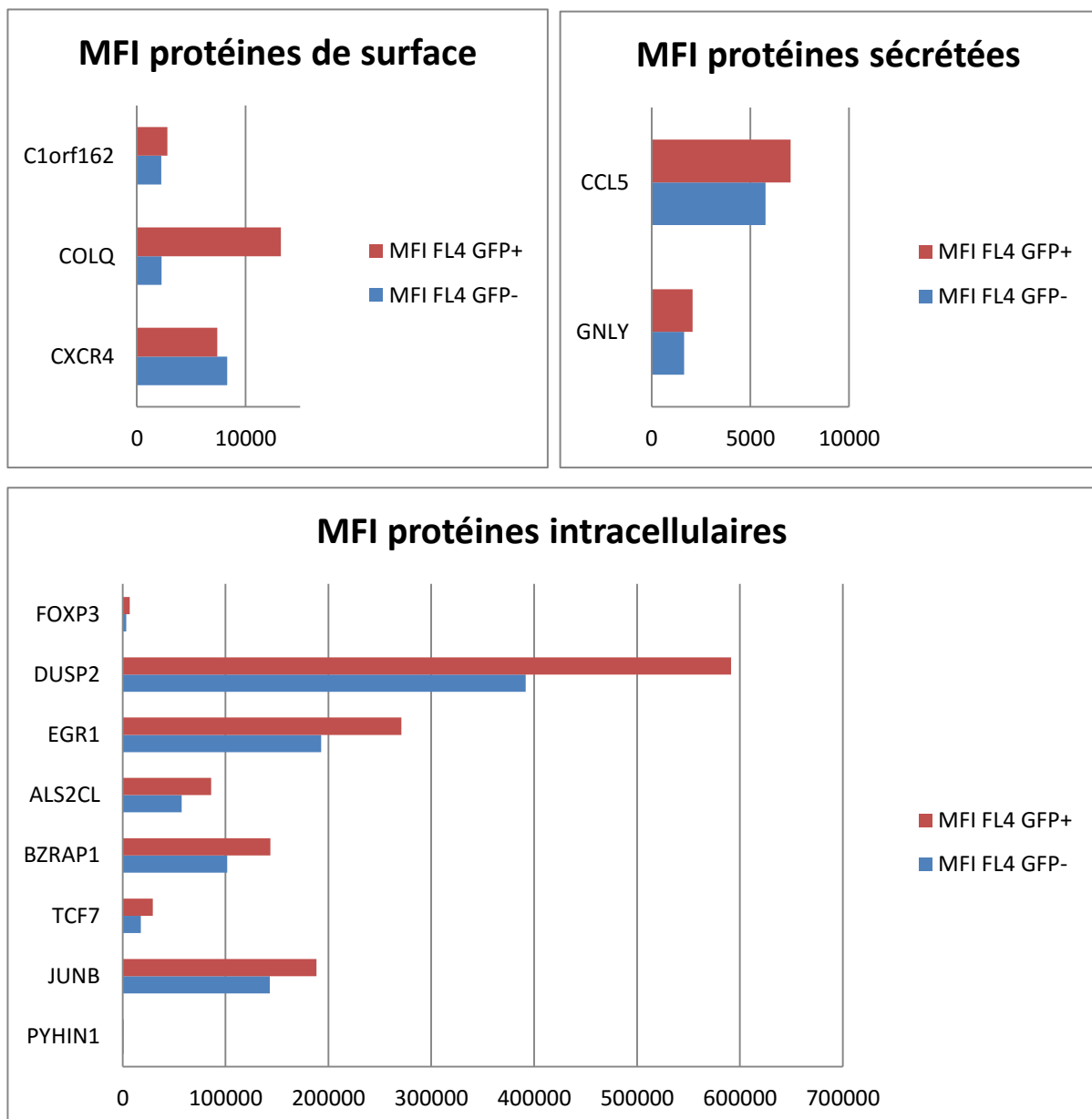
En ce qui concerne les autres gènes, une corrélation entre le nombre de reads » et la MFI de la cytométrie de flux n'est pas très claire. En effet il y a des gènes avec peu de « reads » qui révèlent des MFI relativement importantes au FACS alors qu'à l'inverse certains gènes, comme par exemple EGR1, ont montré un taux important de « reads » mais une expression protéique modeste, ce qui à nouveau ne nous permet pas de faire une corrélation linéaire entre le nombre de « reads » et le taux d'expression protéique.



**Figure 4 | Niveau d'expression des biomarqueurs potentiels de la latence VIH.** Analyse par cytométrie de flux, mesurée par le rapport de la MFI des échantillons avec l'anticorps spécifique dirigé contre le marqueur candidat (M) et des échantillons contenant l'anticorps isotype (I). Les marquages sont séparés selon le type de biomarqueurs : biomarqueurs exprimés à la surface cellulaire (panneau du haut, à gauche), biomarqueurs sécrétés (panneau du haut, à droite), et biomarqueurs exprimés de manière intracellulaire (panneau du bas). Un rapport MFI de M/I de  $\leq 1$  reflète l'absence d'expression protéique (rouge). Un rapport MFI  $> 1$  révèle l'expression spécifique du biomarqueur (bleu). A noter que pour les protéines GNLY et FOXP3, le contrôle ayant été fait avec des CompBeads, la MFI utilisée pour le rapport est celle des cellules « Mock » (non marquées).

### 3.3 Expression protéique des biomarqueurs dans les cellules T CD4<sup>+</sup> infectées par le VIH

La deuxième partie de ce travail a consisté en l'analyse de ces mêmes protéines dans des cellules T CD4<sup>+</sup> activées puis infectées par un virus VIH atténué (NL4-3-Δ6-drEGFP/CXCR4). Le taux d'infection des cellules T CD4<sup>+</sup> était de 27% pour les marquages de surface et de 18% pour les marquages intracellulaires et sécrétés. Les résultats graphiques des analyses par cytométrie de flux sont disponibles dans l'annexe (annexe 8.2).



**Figure 5 | Comparaison des MFI des différents biomarqueurs dans une population cellulaire infectée (GFP+) et une population cellulaire non infectée (GFP-).** Les différents biomarqueurs ont été séparés en différents graphiques en fonction de leur localisation cellulaire. Les MFI des différents biomarqueurs dans les cellules infectées (GFP+) sont indiquées en rouge alors que les MFI de ces mêmes biomarqueurs dans des cellules non infectées (GFP-) sont représentées en bleu.

La **Figure 5** compare cette fois-ci la MFI de chaque marqueur dans les deux populations cellulaires d'intérêt, à savoir les cellules non infectées (et donc GFP-) et les cellules infectées (et donc GFP+).

Les marqueurs présentant une MFI plus élevée dans la population GFP positive sont des marqueurs dont l'expression est augmentée dans les cellules infectées alors qu'à l'inverse les marqueurs dont la MFI est inférieure dans les cellules GFP+ sont des marqueurs moins exprimés dans les cellules infectées.

La majorité des biomarqueurs testés ne semblent pas être exprimés de façon différentielle entre les cellules T CD4<sup>+</sup> GFP négatives et les cellules T CD4<sup>+</sup> GFP positives. Cette observation est faite pour la majorité des biomarqueurs hormis les protéines EGR1, DUSP2 et COLQ qui sont respectivement 1.4x, 1.5x et 5.8x plus représentées dans les cellules infectées, ce qui font d'elles des biomarqueurs potentiels de l'infection par le VIH. Toutefois cette expérience ne permet pas de savoir quel est le potentiel de ces biomarqueurs pour identifier des cellules infectées de manière latente. Pour ce faire, cette expérience devrait être répétée à nouveau sur des cellules infectées et latentes, ce que je n'ai malheureusement pas eu le temps de faire.

## 4. Discussion

L'étude comparative des transcriptomes des cellules infectées de manière latente et de cellules non infectées a mis en évidence 227 gènes différentiellement exprimés, représentant des biomarqueurs potentiels de latence VIH. Nous avons sélectionné 13 de ces biomarqueurs potentiels et les avons testés dans des cellules infectées ou non pour évaluer leur potentiel en tant que biomarqueurs.

Sur ces 13 biomarqueurs, seuls 3 ont été confirmés comme étant différentiellement exprimés entre cellules infectées ou non. Quoi qu'il en soit, de nouvelles analyses sont nécessaires pour évaluer le rôle de ces biomarqueurs dans des cellules latentes.

Si cela devait se confirmer, la protéine COLQ serait un biomarqueur précieux car il est exprimé à la surface cellulaire et permettrait donc de capturer les cellules latentes pour mieux étudier les mécanismes de latence ainsi que pour le développement de thérapies ciblées visant à purger et éliminer les cellules latentes de l'organisme.

## 5. Conclusion

L'identification de biomarqueurs du réservoir viral latent est un domaine de recherche intense à l'heure actuelle mais à ce jour, nous n'avons aucun moyen de capturer ou de cibler de manière spécifique les cellules infectées (latentes ou non). L'identification de biomarqueurs pour le VIH permettrait de progresser grandement dans les efforts visant à éradiquer le VIH puisqu'ils permettraient éventuellement de capturer ces cellules pour les étudier ou encore de pouvoir les cibler directement avec des molécules spécifiques.

## 6. Méthodes

### 6.1 Protocoles expérimentaux

Hormis la partie de marquage et de cytométrie de flux, la totalité des autres étapes a été effectuée par d'autres personnes du laboratoire, notamment par Monsieur Christian Thorball et Monsieur Miguel Munoz.

**Culture cellulaire :** Toutes les cultures cellulaires ont été incubées à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été conservées à une concentration d'environ 1 x 10<sup>6</sup> cellules par ml. Les différents milieux de culture sont décrits dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3 | Liste des différents milieux de culture utilisés pour la culture cellulaire.**

Cellules	Abréviation	Milieu	Antibiotique	Sérum de veau	Cytokines	Commentaires
T CD4 <sup>+</sup> (activées)	Milieu d'expansion	Cell Therapy Systems Optimizer CTS+ GlutaMAX (Life Technologies)	50 µg/ml Gentamicin (Life Technologies)	5% FCS <sup>3</sup> (Life Technologies)	IL-2, 100 U/ml (R&D Systems)	
HEK293T	D10	DMEM <sup>1</sup> +GlutaMAX (Life Technologies)	50µg/ml Gentamicin (Life Technologies)	10% FCS (Life Technologies)		
CD4 <sup>+</sup> (repos)	R10 + IL-2	RPMI <sup>2</sup> Medium 1640 + GlutaMAX (Life Technologies)	50µg/ml Gentamicin (Life Technologies)	10% FCS (Life Technologies)	IL-2, 80 U/ml (R&D Systems)	Mixed 1:1 with R10 from H80 cells

1: *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM)

2: *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI)

3: Sérum de veau fœtal inactivé par la chaleur à 10% (FCS, Life Technologies) qui a été centrifugé 10 minutes à 3000 g pour enlever les débris

**Isolation des cellules T CD4<sup>+</sup> primaires:** Les cellules T CD4<sup>+</sup> primaires ont été purifiées depuis des PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) via une séparation magnétique par déplétion ou sélection négative en utilisant le « EasySep Human CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit » (StemCell Technologies). Les PBMCs ont été d'abord séparées de sang total de donneurs sains par centrifugation de gradient de densité (Leucosep, Greiner Bio-One). Du sang anticoagulé (15-30 ml) a été introduit dans un tube Leucosep contenant 15 ml de milieu de séparation et centrifugé 10 minutes à 1000g. Les PBMCs ont ensuite été cultivés et lavés 2 fois dans 10 ml de PBS. Les PBMCs isolés ont été conservés à approximativement 8 x 10<sup>7</sup> cellules par ml (cryopréservation, voir ci-dessous). Pour l'isolation des cellules T CD4<sup>+</sup>, des PBMCs décongelées ont été resuspendues dans du « RoboSep Buffer » puis le « easySep Humain CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Cocktail » a été rajouté (contient des complexes d'anticorps contre CD8, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD66b,



CD123, TCR $\gamma/\sigma$  et glycophorine A). « EasySep D Magnetic Particles » a ensuite été ajouté dans le tube et placé dans le « EasySep Magnet ». Ceci permet que toutes les cellules exprimant les molécules pré-citées soient retenues dans le « EasySep Magnet » alors que les cellules T CD4<sup>+</sup> ne sont pas capturées. La pureté des cellules T CD4<sup>+</sup> est confirmée par cytométrie de flux via des marquages avec des anticorps anti-CD3, CD4 et CD8.

**Cryoconservation** : Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont resuspendues dans du FCS (*Fetal Calf Serum*) avec 7,5% de DMSO (Dimethyl sulfoxide) pour permettre une bonne congélation. Les cellules sont mises dans des cuves avec de l'isopropanol pour permettre une réfrigération et une congélation lente afin de maintenir les cellules en vie et d'éviter leur explosion, et ce jusqu'à - 80°C. Les cellules sont ensuite transvasées dans un récipient contenant de l'azote liquide (-200°C) pour permettre une conservation à long terme des cellules vivantes.

**Activation des cellules T CD4+** : Les cellules T CD4+ ont été activées par stimulation du *T cell receptor* (plus précisément des molécules CD3 et CD28) en présence d'IL-2 (100 U/ml) (82). Brièvement, 10  $\mu$ g d'anticorps anti-CD3 (BD Biosciences) sont préalablement fixés dans des micro-puits avec 1 ml de PBS par puits et incubés pendant 1.5 heures à 37°C. Les puits sont ensuite lavés avec 5 ml de PBS. Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont ajoutées dans les mêmes puits à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules par ml dans un milieu d'expansion. Par la suite, 1  $\mu$ g/ml d'anticorps anti-CD28 (BD Biosciences) sont ajoutés dans les puits et le tout est incubé pendant 72 heures à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules T CD4<sup>+</sup> ainsi activées sont ensuite lavées, infectées ou non par un vecteur viral, et transférées dans du milieu d'expansion à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules par ml. Après 48 heures, les cellules, infectées ou non, ont été marquées par divers anticorps et analysées par cytométrie de flux.

**Cellules HEK293T** : La lignée cellulaire HEK293T (cellules rénales embryonnaires humaines) a été utilisée pour produire des particules virales par transfection. Les cellules sont cultivées dans du D10. Les plasmides pNL4-3- $\Delta$ 6-drEGFP (plasmide de transfert contenant le signal d'encapsidation et la protéine rapportrice GFP), pGag-Pol (plasmide exprimant les protéines structurales internes et les enzymes virales) et pCXCR4 (plasmide exprimant les protéines structurales externes) sont transfectés dans les cellules HEK293T par la technique de phosphate de calcium (Calcium Phosphate transfection kit, Life Technologies) selon les instructions du fabricant. Après une incubation de 12-16h, les cellules ont été lavées et maintenues en culture encore 38h afin de permettre la production des protéines virales et la production de virions (appelés ici NL4-3- $\Delta$ 6-drEGFP/CXCR4). Le surnageant de culture des cellules, contenant les particules virales, a été récolté, centrifugé pour éliminer les débris cellulaires, filtré à 0.22  $\mu$ m et stocké à -80°C.

**Infection des cellules T CD4+** : Pour l'infection des cellules T CD4+, un virus HIV modifié (appelé NL4-3- $\Delta$ 6-drEGFP/CXCR4) fut utilisé. Les cellules T activées furent infectées par spinoculation à 1500g et à 25°C pendant 3 heures dans des tubes de polypropylène de 5 ml contenant chacun 200'000 cellules, 5  $\mu$ g/ml de polybrène et 5 $\mu$ g d'équivalent p24 dans un volume total de 200  $\mu$ l. Après la spinoculation, les cellules furent récupérées et lavées avec du D10 avant d'être transférées dans du milieu d'expansion à 0.5 x10<sup>6</sup> cellules par ml.

**Cytométrie de flux** : L'expression protéique (à la surface cellulaire, en intracellulaire ou de manière sécrétée) des biomarqueurs choisis a été analysée par cytométrie de flux à l'aide du BD FACS Accuri C6 (BD Biosciences) sur des cellules T CD4+ activées et infectées pendant 48 heures. Les marquages ont été effectués suivant les recommandations décrites dans le protocole du kit « BD

Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit » (BD Biosciences). Toutes les centrifugations pour les lavages ont été effectuées pendant 5 minutes à 300g et à 4°C.

Pour l'analyse de l'expression protéique des protéines de surface, les cellules T CD4<sup>+</sup> (1'400'000 cellules) ont été collectées, centrifugées 5 minutes à 300 g et resuspendues à  $1 \times 10^6$  de cellules par ml dans du « FACS buffer » (composé de PBS + 5% FCS + 2 mM EDTA (Ambion)). Les cellules ont ensuite été centrifugées et resuspendues à nouveau dans du « FACS buffer » avec une concentration de  $2 \times 10^6$  cellules par ml. 200'000 cellules (100  $\mu$ ) ont été transférées dans des tubes 4 ml en polystyrène à fond rond (« tube FACS ») pour effectuer les marquages avec les différents anticorps.

Pour réduire les sites de liaisons non-spécifiques aux récepteurs Fc, 5  $\mu$ l de « Human TruSain FcX » (BioLegend) ont été rajoutés dans chaque tube et le tout a été incubé pendant 5 à 10 minutes à température ambiante. Les anticorps primaires ont ensuite été ajoutés (1  $\mu$ l) et incubés pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois à l'aide de 1 ml de « FACS buffer » et resuspendues à nouveau dans 100  $\mu$ l de « FACS buffer ». Par la suite, l'anticorps secondaire (1  $\mu$ l) conjugué au fluorophore par du DyLight650 a été rajouté et incubé pendant 30 minutes à 4°C. A nouveau les cellules ont été lavées 2 fois et resuspendues enfin dans 300  $\mu$ l de CellFix (BD Biosciences) contenant du formaldéhyde afin de fixer les cellules pour l'analyse de cytométrie de flux. Les cellules ont été stockées dans le noir à 4°C et analysées dans les 5 jours par cytométrie de flux.

Pour l'expression protéique des protéines intracellulaires, les cellules T CD4<sup>+</sup> (1'800'000 cellules) ont été collectées, centrifugées et resuspendues dans du « Cytofix/Cytoperm buffer » (BD Biosciences) à raison de 1ml par  $1 \times 10^6$  cellules. Les cellules ont été incubées 20 minutes à 4°C afin de perméabiliser les membranes cellulaires et simultanément fixer les structures cellulaires, permettant ainsi aux anticorps de pénétrer dans les cellules et de se lier à leur antigène. Les cellules ont été lavées 2 fois avec 5 ml de « BD Perm/Wash buffer » avant d'être resuspendues dans du « BD Perm/Wash buffer » à  $2 \times 10^6$  cellules par ml. Par la suite, 100 $\mu$ l de la suspension cellulaire a été transférée dans chaque tube FACS, ce qui équivaut à 200'000 cellules par tube. Comme pour l'analyse des protéines de surface, 5  $\mu$ l de « Humain TruStain FcX » (BioLegend) a été ajouté dans chaque tube pour réduire les sites de liaisons non-spécifiques. Les anticorps primaires (1 $\mu$ l) ont été ajoutés et incubés 30 min à 4°C. Les cellules ont été lavées 2 fois dans 1 ml de « BD Perm/Wash buffer » et resuspendues dans 100  $\mu$ l de « BD Perm/Wash buffer ». Par la suite, l'adjonction des anticorps secondaires (1 $\mu$ l) conjugués au DyLight650 a été effectuée comme décrit ci-dessus. Une fois lavées à nouveau 2 fois, les cellules ont été resuspendues dans 300  $\mu$ l de « CellFix » et furent analysées par cytométrie de flux dans les 24 heures.

Pour l'analyse des protéines normalement sécrétées, les cellules (100'000 cellules) ont été préalablement traitées pendant 6 heures avec 0.66  $\mu$ l de « BD GolgiStop » (BD Biosciences) par ml de culture cellulaire. « BD GolgiStop » agit comme un inhibiteur de transport protéique et permet l'accumulation intracellulaire des protéines normalement sécrétées. Après 6 heures d'incubation, les cellules ont été perméabilisées, fixées et marquées de la même manière que pour l'analyse des protéines intracellulaires décrite ci-dessus.

**Tableau 4 | Liste des anticorps utilisés dans cette étude.**

Anticorps	Gene ID	Localisation cellulaire	Compagnie	N° catalogue	Commentaires
Isotype control	NA	NA	BioLegend	400330	Mouse IgG2b, κ, dilution 1 :100
Isotype control	NA	NA	BioLegend	400220	Mouse IgG2a, κ, dilution 1 :100
Isotype control	NA	NA	BioLegend	400136	Mouse (BALB/c) IgG1, κ, dilution 1 :100
Isotype control	NA	NA	Santa Cruz	sc-3888	Normal rabbit IgG, dilution 1 :100
Isotype control	NA	NA	Santa Cruz	sc-3887	Normal goat IgG, dilution 1 :100
CCL5	20304	Sécrétée	BioLegend	515506	Mouse IgG2b, κ, Alexa Fluor 647, dilution 1 :100
CXCR4	7852	Surface	BioLegend	306510	Mouse IgG2a, κ, APC, dilution 1 :100
GNLY	10578	Sécrétée	BioLegend	348006	Mouse IgG1, κ, Alexa Fluor 647, dilution 1 :100
PYHIN1	149628	Intracellulaire	LifeSpan BioSciences	LS-C162341	Rabbit polyclonal, dilution 1 :100
FOXP3	50943	Intracellulaire	BioLegend	320114	Mouse IgG1, κ, Alexa Fluor 647, dilution 1 :100
EGR1	1958	Intracellulaire	Bioss antibodies	bs-1076R	Rabbit polyclonal IgG, dilution 1 :100
JUNB	3726	Intracellulaire	anticorps-enligne	ABIN963099	Rabbit polyclonal IgG, dilution 1 :100
DUSP2	1844	Intracellulaire	Bioss antibodies	bs-7609R	Rabbit polyclonal IgG, dilution 1 :100
TCF7	6932	Intracellulaire	anticorps-enligne	ABIN222575	Rabbit polyclonal, dilution 1 :100
BZRAP1	9256	Intracellulaire	anticorps-enligne	ABIN549428	Rabbit polyclonal, dilution 1 :100
C1orf162	128346	Surface	Santa Cruz	sc-138864	Rabbit polyclonal IgG, dilution 1 :100
COLQ	8292	Surface	Santa Cruz	sc-69155	Goat polyclonal IgG, dilution 1 :100
ALS2CL	259173	Intracellulaire	Santa Cruz	sc-134561	Rabbit polyclonal IgG, dilution 1 :100
Anticorps secondaire	NA	NA	Abcam	ab96906	Rabbit Anti-Human IgG H&L (DyLight® 650), dilution 1 :100
Anticorps secondaire	NA	NA	Abcam	ab96910	Goat Anti-Human IgG H&L (DyLight® 650), dilution 1 :100

NA signifie non-applicable. Un isotype est un anticorps non-spécifique et donc ne correspond pas à un gène spécifique, raison pour laquelle il n'y a pas de « gene ID » ni de localisation cellulaire précisée.

## 7. Bibliographie

1. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 9 janv 2011;1(1):a006841.
2. UNAIDS. Fact Sheet 2014 Global Statistics [Internet]. [cité 29 oct 2015]. Disponible sur: [http://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/20150714\\_FS\\_MDG6\\_Report\\_en.pdf](http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20150714_FS_MDG6_Report_en.pdf)
3. Towards an HIV cure: a global scientific strategy. *Nat Rev Immunol.* 20 juill 2012;12(8):607-14.
4. Phillips AN, Neaton J, Lundgren JD. The Role of HIV in Serious Diseases Other than AIDS. *AIDS Lond Engl.* 30 nov 2008;22(18):2409-18.
5. Barbaro G. Metabolic and cardiovascular complications of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. *Curr HIV Res.* janv 2006;4(1):79-85.
6. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 3 mars 2000;100(5):587-97.
7. Cicala C, Martinelli E, McNally JP, Goode DJ, Gopaul R, Hiatt J, et al. The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8 déc 2009;106(49):20877-82.
8. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, Wei D, et al. HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol.* mars 2008;9(3):301-9.
9. Saphire AC, Bobardt MD, Zhang Z, David G, Galloway PA. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol.* oct 2001;75(19):9187-200.
10. Orloff GM, Orloff SL, Kennedy MS, Maddon PJ, McDougal JS. Penetration of CD4 T cells by HIV-1. The CD4 receptor does not internalize with HIV, and CD4-related signal transduction events are not required for entry. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 avr 1991;146(8):2578-87.
11. McDougal JS, Kennedy MS, Sligh JM, Cort SP, Mawle A, Nicholson JK. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science.* 24 janv 1986;231(4736):382-5.
12. Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell.* 7 nov 1986;47(3):333-48.
13. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 18 juin 1998;393(6686):648-59.
14. Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature.* 24 févr 2005;433(7028):834-41.
15. Berger EA, Doms RW, Fenyö EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, et al. A new classification for HIV-1. *Nature.* 15 janv 1998;391(6664):240.

16. Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*. 22 mai 1997;387(6631):426-30.
17. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*. 18 avr 1997;89(2):263-73.
18. Hu W-S, Hughes SH. HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 10 janv 2012;2(10):a006882.
19. Craigie R, Bushman FD. HIV DNA Integration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 7 janv 2012;2(7):a006890.
20. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2 janv 2012;2(2):a006916.
21. Hakre S, Chavez L, Shirakawa K, Verdin E. HIV latency: experimental systems and molecular models. *FEMS Microbiol Rev*. mai 2012;36(3):706-16.
22. Smith MZ, Wightman F, Lewin SR. HIV reservoirs and strategies for eradication. *Curr HIV/AIDS Rep*. mars 2012;9(1):5-15.
23. Folks T, Powell DM, Lightfoote MM, Benn S, Martin MA, Fauci AS. Induction of HTLV-III/LAV from a nonvirus-producing T-cell line: implications for latency. *Science*. 7 févr 1986;231(4738):600-2.
24. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 4 mars 1997;94(5):1925-30.
25. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*. août 2009;15(8):893-900.
26. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*. 12 janv 1995;373(6510):117-22.
27. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 12 janv 1995;373(6510):123-6.
28. Siliciano RF, Greene WC. HIV Latency. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 9 janv 2011;1(1):a007096.
29. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*. mai 1999;5(5):512-7.
30. Jordan A, Bisgrove D, Verdin E. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *EMBO J*. 15 avr 2003;22(8):1868-77.
31. Han Y, Lassen K, Monie D, Sedaghat AR, Shimoji S, Liu X, et al. Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *J Virol*. juin 2004;78(12):6122-33.



32. Bai L, Morozov AV. Gene regulation by nucleosome positioning. *Trends Genet TIG*. nov 2010;26(11):476-83.
33. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 23 févr 2007;128(4):635-8.
34. Fischle W, Wang Y, Allis CD. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature*. 2 oct 2003;425(6957):475-9.
35. Verdin E, Paras P, Van Lint C. Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *EMBO J*. août 1993;12(8):3249-59.
36. Van Lint C, Emiliani S, Ott M, Verdin E. Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J*. 1 mars 1996;15(5):1112-20.
37. Coull JJ, Romerio F, Sun JM, Volker JL, Galvin KM, Davie JR, et al. The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J Virol*. août 2000;74(15):6790-9.
38. Hsia S-CV, Shi Y-B. Chromatin disruption and histone acetylation in regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by thyroid hormone receptor. *Mol Cell Biol*. juin 2002;22(12):4043-52.
39. Williams SA, Chen L-F, Kwon H, Ruiz-Jarabo CM, Verdin E, Greene WC. NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J*. 11 janv 2006;25(1):139-49.
40. Archin NM, Cheema M, Parker D, Wiegand A, Bosch RJ, Coffin JM, et al. Antiretroviral intensification and valproic acid lack sustained effect on residual HIV-1 viremia or resting CD4+ cell infection. *PLoS One*. 2010;5(2):e9390.
41. Siliciano JD, Lai J, Callender M, Pitt E, Zhang H, Margolick JB, et al. Stability of the latent reservoir for HIV-1 in patients receiving valproic acid. *J Infect Dis*. 15 mars 2007;195(6):833-6.
42. Ke R, Lewin SR, Elliott JH, Perelson AS. Modeling the Effects of Vorinostat In Vivo Reveals both Transient and Delayed HIV Transcriptional Activation and Minimal Killing of Latently Infected Cells. *PLoS Pathog*. oct 2015;11(10):e1005237.
43. Mohammadi P, di Iulio J, Muñoz M, Martinez R, Bartha I, Cavassini M, et al. Dynamics of HIV Latency and Reactivation in a Primary CD4+ T Cell Model. *PLoS Pathog*. 29 mai 2014;10(5):e1004156.
44. Kauder SE, Bosque A, Lindqvist A, Planelles V, Verdin E. Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathog*. juin 2009;5(6):e1000495.
45. Schröder ARW, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 23 août 2002;110(4):521-9.
46. Lenasi T, Contreras X, Peterlin BM. Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency. *Cell Host Microbe*. 14 août 2008;4(2):123-33.

47. Cherrier T, Le Douce V, Redel L, Marban C, Aunis D, Rohr O, et al. Un virus tapi dans l'ombre : les bases moléculaires de la latence du VIH-1: Partie II : la réactivation de la latence du VIH-1 et ses implications thérapeutiques. *médecine/sciences*. mars 2010;26(3):291-6.
48. Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 19 oct 2015]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Colin+L%2C+Van+Lint+C.+2009.Molecular+control+of+HIV-1+postintegration+latency%3A+Implications+for+the+development+of+new+therapeutic+strategies.+Retrovirology+6%3A+111>.
49. Chen L-F, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mai 2004;5(5):392-401.
50. Chen Lf null, Fischle W, Verdin E, Greene WC. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science*. 31 août 2001;293(5535):1653-7.
51. Chen L, Mu Y, Greene WC. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J*. 2 déc 2002;21(23):6539-48.
52. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*. 16 juin 2004;23(12):2369-80.
53. Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein inhibits the SIRT1 deacetylase and induces T cell hyperactivation. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 19 oct 2015]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kwon+HS%2C+Brent+MM%2C+Getachew+R%2C+Jayakumar+P%2C+Chen+LF%2C+Schnolzer+M%2C+McBurney+MW%2C+Marmorstein+R%2C+Greene+WC%2C+Ott+M.+2008.+Human+immunodeficiency+virus+type+1+Tat+protein+inhibits+the+SIRT1+deacetylase+and+induces+T+cell+hyperactivation.+Cell+Host+Microbe+3%3A+158%E2%80%93167>.
54. Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*. 26 mars 1993;259(5103):1912-5.
55. Barboric M, Peterlin BM. A new paradigm in eukaryotic biology: HIV Tat and the control of transcriptional elongation. *PLoS Biol*. févr 2005;3(2):e76.
56. Karn J. The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Curr Opin HIV AIDS*. janv 2011;6(1):4-11.
57. Parada CA, Roeder RG. Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature*. 28 nov 1996;384(6607):375-8.
58. Bourgeois CF, Kim YK, Churcher MJ, West MJ, Karn J. Spt5 cooperates with human immunodeficiency virus type 1 Tat by preventing premature RNA release at terminator sequences. *Mol Cell Biol*. févr 2002;22(4):1079-93.
59. Fujinaga K, Irwin D, Huang Y, Taube R, Kurosu T, Peterlin BM. Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol*. janv 2004;24(2):787-95.

60. Dornadula G, Zhang H, VanUitert B, Stern J, Livornese L, Ingerman MJ, et al. Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA*. 3 nov 1999;282(17):1627-32.
61. Maldarelli F, Palmer S, King MS, Wiegand A, Polis MA, Mican J, et al. ART suppresses plasma HIV-1 RNA to a stable set point predicted by pretherapy viremia. *PLoS Pathog*. avr 2007;3(4):e46.
62. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*. 15 mars 1996;271(5255):1582-6.
63. Tobin NH, Learn GH, Holte SE, Wang Y, Melvin AJ, McKernan JL, et al. Evidence that low-level viremias during effective highly active antiretroviral therapy result from two processes: expression of archival virus and replication of virus. *J Virol*. août 2005;79(15):9625-34.
64. Bailey JR, Sedaghat AR, Kieffer T, Brennan T, Lee PK, Wind-Rotolo M, et al. Residual human immunodeficiency virus type 1 viremia in some patients on antiretroviral therapy is dominated by a small number of invariant clones rarely found in circulating CD4+ T cells. *J Virol*. juill 2006;80(13):6441-57.
65. Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, Kaplan MH, Gallo RC, Popovic M. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science*. 11 juill 1986;233(4760):215-9.
66. Igarashi T, Brown CR, Endo Y, Buckler-White A, Plishka R, Bischofberger N, et al. Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 janv 2001;98(2):658-63.
67. Gras G, Kaul M. Molecular mechanisms of neuroinvasion by monocytes-macrophages in HIV-1 infection. *Retrovirology*. 2010;7:30.
68. Carter CC, Onafuwa-Nuga A, McNamara LA, Riddell J, Bixby D, Savona MR, et al. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat Med*. avr 2010;16(4):446-51.
69. Dinoso JB, Kim SY, Wiegand AM, Palmer SE, Gange SJ, Cranmer L, et al. Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 juin 2009;106(23):9403-8.
70. Dinoso JB, Rabi SA, Blankson JN, Gama L, Mankowski JL, Siliciano RF, et al. A simian immunodeficiency virus-infected macaque model to study viral reservoirs that persist during highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. sept 2009;83(18):9247-57.
71. Gandhi RT, Bosch RJ, Aga E, Albrecht M, Demeter LM, Dykes C, et al. No Evidence for Decay of the Latent Reservoir in HIV-1—Infected Patients Receiving Intensive Enfuvirtide-Containing Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis*. 15 janv 2010;201(2):293-6.
72. Gandhi RT, Zheng L, Bosch RJ, Chan ES, Margolis DM, Read S, et al. The Effect of Raltegravir Intensification on Low-level Residual Viremia in HIV-Infected Patients on Antiretroviral Therapy: A Randomized Controlled Trial. *PLoS Med*. 10 août 2010;7(8):e1000321.

73. Deeks SG. HIV: Shock and kill. *Nature*. 26 juill 2012;487(7408):439-40.
74. Davey RT, Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 déc 1999;96(26):15109-14.
75. Prins JM, Jurriaans S, van Praag RM, Blaak H, van Rij R, Schellekens PT, et al. Immuno-activation with anti-CD3 and recombinant human IL-2 in HIV-1-infected patients on potent antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl*. 3 déc 1999;13(17):2405-10.
76. Van Lint C, Bouchat S, Marcello A. HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology*. 2013;10:67.
77. Biancotto A, Grivel J-C, Gondois-Rey F, Bettendroffer L, Vigne R, Brown S, et al. 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*. oct 2004;78(19):10507-15.
78. Beans EJ, Fournogerakis D, Gauntlett C, Heumann LV, Kramer R, Marsden MD, et al. Highly potent, synthetically accessible prostratin analogs induce latent HIV expression in vitro and ex vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16 juill 2013;110(29):11698-703.
79. Darcis G, Kula A, Bouchat S, Fujinaga K, Corazza F, Ait-Ammar A, et al. An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various In Vitro and Ex Vivo HIV-1 Latency Models Identified Bryostatins-1+JQ1 and Ingenol-B+JQ1 to Potently Reactivate Viral Gene Expression. *PLoS Pathog*. juill 2015;11(7):e1005063.
80. Doyon G, Zerbato J, Mellors JW, Sluis-Cremer N. Disulfiram reactivates latent HIV-1 expression through depletion of the phosphatase and tensin homolog. *AIDS Lond Engl*. 14 janv 2013;27(2):F7-11.
81. Xing S, Bullen CK, Shroff NS, Shan L, Yang H-C, Manucci JL, et al. Disulfiram reactivates latent HIV-1 in a Bcl-2-transduced primary CD4+ T cell model without inducing global T cell activation. *J Virol*. juin 2011;85(12):6060-4.
82. Establishment of HIV Latency in Primary CD4+ Cells Is due to Epigenetic Transcriptional Silencing and P-TEFb Restriction [Internet]. [cité 15 oct 2015]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2903277/>
83. Yang H-C, Xing S, Shan L, O'Connell K, Dinoso J, Shen A, et al. Small-molecule screening using a human primary cell model of HIV latency identifies compounds that reverse latency without cellular activation. *J Clin Invest*. 2 nov 2009;119(11):3473-86.