



HAL
open science

KAP1 : un nouveau facteur répresseur de la transcription du VIH-1

Amina Ait Ammar

► **To cite this version:**

Amina Ait Ammar. KAP1 : un nouveau facteur répresseur de la transcription du VIH-1. Virologie. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ073 . tel-02918059

HAL Id: tel-02918059

<https://theses.hal.science/tel-02918059v1>

Submitted on 20 Aug 2020

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

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

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
EA7292 - Dynamique des interactions hôte pathogène

THÈSE présentée par :
Amina AIT AMMAR

Soutenue le : **28 Septembre 2018**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : **Sciences du vivant**

Spécialité : **Aspect cellulaire et moléculaire de la Biologie**

**KAP1 : un nouveau facteur répresseur de la
transcription du VIH-1**

THÈSE dirigée par :

M. Olivier ROHR Professeur, Université de Strasbourg
Mme. Virginie GAUTIER Docteur, Université de Dublin, Irlande

RAPPORTEURS :

Mme. Angela CIUFFI Directrice de recherche, Université de Lausanne,
Suisse
M. Georges HERBEIN Professeur, Université de Franche-Comté

Examineurs :

Mme. Carine VAN LINT Professeur, Université de Bruxelles, Belgique
M. Matteo NEGRONI Directeur de recherche, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury : mes deux rapporteurs : Angela Ciuffi et Georges Herbein ainsi que mes deux examinateurs : Carine Van Lint et Matteo Negroni, qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je tiens, également, à remercier Sidaction pour m'avoir accordé le financement de bourse de doctorat durant mes trois premières années de thèse.

Je remercie vivement mon directeur de thèse, Olivier ROHR, de m'avoir accueillie au sein de son équipe, de m'avoir soutenue, aidée et suivie tout au long de ces quatre années. La confiance, la liberté de réflexions et de décisions qu'il m'a accordées ont contribué à l'élaboration de ce travail et m'ont permis d'acquérir une plus grande maturité dans la gestion de mon projet de recherche. Je te remercie pour la lecture attentive très efficace et pour les corrections de mon manuscrit. Merci de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer les différents séjours au sein des laboratoires de Carine Van Lint à Bruxelles et de Virginie Gautier à Dublin. Ce furent des expériences très enrichissantes tant sur le plan scientifique qu'humain.

Je remercie ma co-directrice de thèse, Virginie Gautier, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire durant mes 2 séjours à UCD. Je te remercie pour ton encadrement, tes conseils avisés, tes opinions tranchées et l'organisation de « journal club », qui grâce à toi et ton savoir scientifique, m'ont permis de mettre à jour la bibliographie. Merci pour ta contribution à la correction de ma thèse.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Carine Van Lint, pour m'avoir fait une place au sein de son équipe lors de mes séjours à l'ULB. C'est finalement avec vous que je termine ces quatre années de travail. Merci pour avoir été disponible et attentive à l'avancement de mon projet de thèse.

Je tiens à remercier Sophie Bouchat, Sylvain Fauquenoy, Anthony Rodari, Benoît Van Driessche, Caroline Vanhulle, Roxane Verdikt, Maxime Bellefroid, Lauréna Nestola et Estelle Plant pour leur grande sympathie, leur aide, leur recommandation, leur encadrement, leurs conseils scientifiques judicieux et leur bonne humeur. J'ai vraiment apprécié travailler avec vous.

Merci à mes amies de laboratoire Fanny et Ahlam, pour leur écoute, leur gentillesse et pour n'avoir jamais hésité à me remonter le moral dès qu'elles sentaient que ce n'était pas la grande forme. Même si nous n'avions pas eu énormément d'occasions pour sortir, car mon passage à UCD coïncidait avec les derniers durs instants de cette thèse, j'espère que nous ne manquerons pas de rattraper cela. Je remercie également les anciens du CRID, Valentin Le Douce et Ann Marie Mc Cartin qui m'ont bien épaulé, aidé et orienté lors de mon premier séjour à UCD. Vous avez toujours répondu à toutes mes interrogations et mes besoins en matière de plasmides.

Je remercie l'ensemble de mon équipe strasbourgeoise : Christian Schwartz, Fadoua Daouad, Marco Derovere, Clémentine Wallet et Jeanne Van Assche pour votre disponibilité et votre enthousiasme.

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'Institut de Parasitologie de Strasbourg : Ermanno Candolfi, Julie Brunet, Cécile Lang, Esternina Hoffman, Lydia Arnoux, Alexander Pfaff, Bruno Mathieu, Marcella Sabou, Faiza Fahmi, Violaine Philippe et Marcelo Avalos pour leur aide et leur soutien. Merci pour toutes les petites pauses café et les bons moments qui ont rendu plaisantes les longues journées passées au laboratoire.

Je tiens à remercier ma famille Irlandaise Joe et Vicki, pour leur accueil chaleureux et leur gentillesse. Merci Joe pour toutes nos longues discussions durant lesquelles j'ai pu connaître toute l'histoire de votre famille et exercer mon anglais avec un dublinois de souche ! Vicki tu as été une sœur pour moi, toujours là pour m'aider, me remonter le moral et me faire découvrir ton pays. Je n'oublierai jamais nos diners, nos fous rires et nos sorties après de longues journées au labo.

Je souhaite remercier mes parents, ma sœur et mon frère pour leur soutien, leur encouragement, leur présence et leur patience durant cette grande aventure. Malgré la distance qui nous séparait, nos discussions quotidiennes et vos visites à Strasbourg m'ont donné l'énergie nécessaire à la réalisation de mes objectifs. Merci pour les valeurs que vous m'avez transmises, vos sacrifices et votre amour éternel.

Enfin, je remercie mon ami et époux pour son amour inconditionnel, sa bienveillance et son soutien. Tu as toujours fait preuve de patience, malgré la distance qui nous séparait. Tu as toujours compris l'importance que représentait ce travail pour moi quand ton entourage n'y comprenait rien. Tu m'as toujours encouragé à élever plus haut mes ambitions, car tu sais que rester dans sa zone de confort n'a jamais été synonyme de réussite.

Table des matières

Généralités : le Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH-1.....1

1-	Histoire et découverte	1
2-	Epidémiologie	2
3-	Description de la particule virale	3
3.1-	Morphologie du virion mature	3
3.2-	Organisation du génome viral.....	4
4-	La réplication du VIH-1	6
4.1-	La phase précoce	7
4.1.1-	L'entrée du virus	7
4.1.2-	La décapsidation et la transcription inverse	9
4.1.3-	L'intégration du génome viral.....	14
4.2-	La phase tardive.....	15
4.2.1-	Expression du DNA viral intégré	15
4.2.1.1-	Structure du promoteur viral.....	15
4.2.1.2-	Transcription du VIH-1.....	17
4.2.1.3-	P-TEFb, un facteur clé de la transcription Tat dépendante du VIH-1	18
4.2.2-	Epissage, export et traduction des RNA du VIH-1.....	24
4.2.3-	Les protéines du VIH-1	27
4.2.4-	Assemblage de la particule virale.....	30
4.2.5-	Bourgeonnement du virus.....	31
4.2.6-	Maturation des particules virales.....	32

Le transactivateur de la transcription du VIH-1 : Tat.....33

1-	Organisation structurale de Tat.....	33
2-	Import et accumulation nucléaire de Tat.....	34
3-	Accumulation nucléolaire de Tat	35
4-	Activation de la synthèse des transcrits viraux par Tat	35
4.1-	Activation de la transcription par Tat au travers de son interaction avec P-TEFb	36
4.2-	Autres rôles de Tat dans la synthèse des transcrits viraux	36
4.2.1-	Interaction de Tat avec les histones acétyltransférase (HATs)	36
4.2.2-	Interaction de Tat avec d'autres protéines impliquées dans la transcription du VIH-1.....	37

5- Les modifications post-traductionnelles de Tat régulant son activité transcriptionnelle.....	38
5.1- Les modifications qui inhibent l'activité de Tat.....	38
5.2- Les modifications activatrices de Tat.....	38
6- Rôle de Tat dans la transcription inverse du VIH-1.....	40
7- Tat est une protéine multifonctionnelle.....	41
8- Tat : une cible thérapeutique.....	44

La pathogénie du VIH-1.....45

1- Transmission du VIH-1.....	45
2- Evolution clinique de l'infection à VIH-1.....	46
3- Les premières cibles de l'infection, de l'amplification et de la dissémination virale	48
4- Les cibles cellulaires du virus.....	49
4.1- Les cellules dendritiques.....	49
4.2- Les lymphocytes T.....	51
4.3- Les lymphocytes B.....	54
4.4- Les monocytes et les macrophages.....	55
4.5- Les cellules NK.....	57
4.6- Les cellules du système nerveux central.....	59
5- Les traitements.....	64
6- Situation actuelle des traitements du VIH-1.....	66
7- Limites et perspectives de la thérapie anti-VIH-1.....	67

La latence virale.....70

1- Les réservoirs anatomiques.....	70
2- Les réservoirs cellulaires.....	72
3- La latence pré et post-intégrative.....	76
4- Mécanismes de la latence post-intégrative.....	77
4.1- Site et orientation de l'intégration.....	77
4.2- Disponibilité des facteurs cellulaires et viraux de transcription et d'élongation	79
4.3- Structure de la chromatine et régulation épigénétique de la latence virale post-intégrative.....	80
4.3.1- Structure de la chromatine.....	80
4.3.2- Les modifications post-traductionnelles des histones.....	81

4.3.2.1-	Les marques d’histones associées à une activation transcriptionnelle du VIH-1.....	82
4.3.2.2-	Les marques d’histones associées à une répression transcriptionnelle du VIH-1.....	84
4.3.3-	La méthylation du DNA	86
4.4-	La régulation post-transcriptionnelle de la latence	88
4.5-	MicroRNA et latence	89
5-	Les stratégies actuelles qui visent l'élimination du réservoir latent	89
5.1-	La stratégie du « shock and kill »	91
5.2-	La stratégie de guérison fonctionnelle ou « block and lock »	94

La machinerie de sumoylation96

1-	Les protéines SUMO	96
2-	Le cycle de sumoylation	97
2.1-	Sélection des sites cibles accepteurs de sumoylation.....	98
2.2-	L’enzyme de conjugaison E2.....	99
2.3-	Les SUMO E3 ligases.....	100
2.4-	Les SUMO protéases.....	100
3-	Les relations entre la sumoylation et d’autres modifications des lysines	102
3.1-	SUMO et l’ubiquitination.....	102
3.2-	SUMO et l’acétylation	103
4-	Régulation de la transcription par SUMO.....	103
4.1-	Régulation de l’activité des facteurs de transcription par SUMO	103
4.2-	Sumoylation des histones.....	105
4.3-	Sumoylation des facteurs de remodelage de la chromatine	106
5-	La sumoylation à l’interface hôte-virus	107

Le répresseur transcriptionnel KAP1112

1-	Structure de KAP1	112
2-	Les modifications post-traductionnelles de KAP1	113
3-	Recrutement génique de KAP1 et régulation transcriptionnelle.....	115
4-	Activité enzymatique de KAP1	116
5-	Implication de KAP1 dans la latence virale.....	117

Le répresseur transcriptionnel CTIP2120

1-	CTIP2, un inhibiteur du facteur d’élégation P-TEFb	121
2-	Implication de CTIP2 dans la régulation du VIH-1.....	121

3- CTIP2 n'est pas uniquement répresseur	123
4- Implication de CTIP2 en pathologies	124
5- Implications thérapeutiques	125
Objectif du projet de thèse.....	126
Résultats.....	128
Publication 1	128
Publication 2 (en préparation)	130
1- Identification des complexes associés à BCL11b/CTIP2 par spectrométrie de masse quantitative.....	131
2- Validation de l'interaction entre CTIP2 et KAP1.....	132
3- Identification des domaines d'interaction entre CTIP2 et KAP1	132
4- Tat interagit avec KAP1 et entre en compétition avec l'association KAP1-CTIP2 135	
5- KAP1 induit la dégradation de Tat par la voie du protéasome	137
6- Importance de la voie SUMO dans le contrôle de la dégradation de Tat et de son interaction avec KAP1.....	138
7- UBC9 induit la dégradation de Tat	141
8- KAP1 inhibe la phase précoce et tardive Tat dépendante de la transcription du VIH-1	143
9- La déplétion d'UBC9 active la transcription basale et Tat dépendante du VIH-1 144	
10- KAP1 et CTIP2 coopèrent pour réprimer la transcription du VIH-1	145
Matériel et méthode.....	147
1- Les plasmides	147
2- Les lignées cellulaires	147
3- Anticorps et réactifs	147
4- Extraction protéique	148
5- Les essais de co-immunoprécipitation et Western blot.....	149
6- La spectrométrie de masse	149
7- La microscopie confocale et l'immunofluorescence	149
8- Les essais Luciférase	150
9- La quantification des mRNA.....	150
10- Analyse statistique	150

Discussion et perspectives151

- 1- Les principaux complexes associés à CTIP2 et leur implication dans la transcription du VIH-1 152
- 2- KAP1, un nouveau partenaire de CTIP2 158
- 3- KAP1 comme CTIP2 interagit et colocalise avec le transactivateur du VIH-1 Tat 159
- 4- KAP1 conduit à la dégradation de Tat par le protéasome 159
- 5- La voie SUMO est impliquée dans la dégradation de Tat 163
- 6- KAP1 et UBC9 inhibent la transcription du VIH-1 165
- 7- KAP1 et la voie SUMO comme nouvelles cibles dans les stratégies LRAs ? 167

Bibliographie170

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la particule du VIH-1	4
Figure 2 : Organisation du génome proviral du VIH-1	6
Figure 3 : Caractéristiques générales du cycle de réplication du VIH-1	7
Figure 4 : Mécanisme d'entrée du VIH-1	7
Figure 5 : Modèle d'infection des cellules T par les DC	9
Figure 6 : Migration du RTC vers le noyau et décapsidation	10
Figure 7 : Illustration des différentes étapes de transcription inverse	11
Figure 8 : Import nucléaire du PIC	12
Figure 9 : Mécanisme d'intégration du génome viral du VIH-1	15
Figure 10 : Organisation schématique de l'extrémité 5' du Promoteur du VIH-1, après transcription inverse et intégration	16
Figure 11 : Initiation de la transcription du VIH-1	17
Figure 12 : Séquestration de P-TEFb dans le 7SK snRNP et sa libération, en réponse à l'activation de diverses voies de signalisations	19
Figure 13 : Recrutement de P-TEFb par Brd4	21
Figure 14 : Recrutement de P-TEFb par Tat et formation du SEC	24
Figure 15 : Emplacements des sites d'épissage des exons et des éléments épissés dans le génome du VIH-1	25
Figure 16 : Cycle d'export des RNA viraux par Rev	26
Figure 17 : Assemblage, bourgeonnement et maturation de la particule virale	31
Figure 18 : Diagramme représentant les domaines fonctionnels de Tat	34
Figure 19 : Régulation de la fonction Tat par modifications post-traductionnelles	40
Figure 20 : Evolution clinique de l'infection par le VIH-1	46
Figure 21 : Modèle de passage du VIH-1 au travers de la barrière muqueuse	49
Figure 22 : Voies de passage du VIH-1 entre les DC et les cellules T	50
Figure 23 : Réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T	53
Figure 24 : Effets du VIH-1 sur les lymphocytes B	55
Figure 25 : Représentation schématique de l'infection des monocytes et des macrophages	57
Figure 26 : Les principales caractéristiques de l'infection du SNC par le VIH-1	60
Figure 27 : Les principaux effets du VIH-1 sur les cellules du SNC	64
Figure 28 : Représentation des principales caractéristiques des réservoirs de VIH-1 dans les principaux sites anatomiques de l'infection	72
Figure 29 : Etablissement et maintien des cellules T infectées latentes	74
Figure 30 : Figure simplifiée des multiples mécanismes d'interférence transcriptionnelle, impliqués dans la latence post-intégrative du VIH-1	78
Figure 31 : Représentation des différents niveaux de compaction du DNA	81
Figure 32 : Réactions d'acétylation (A) et de méthylation (B) des lysines des histones	82
Figure 33 : Recrutement des HDACs et HATs au promoteur viral	83
Figure 34 : Mécanismes moléculaires de latence du VIH-1	88
Figure 35 : Les agents réactivateurs de la latence du VIH-1	91
Figure 36 : La stratégie du « block and lock »	95
Figure 37 : Représentation schématique des étapes du cycle de sumoylation	98
Figure 38 : Les mécanismes de reconnaissance des sites lysines accepteurs de Sumo	99
Figure 39 : Les Activités de sumoylation et désomoylation des SENPs	102

Figure 40 : SUMO contrôle l'activité des facteurs de transcription selon divers mécanismes	105
Figure 41 : Les virus ciblant SUMO et les SAE 1/2	109
Figure 42 : Les virus ciblant UBC9.	110
Figure 43 : La structure et les modifications post-traductionnelles de KAP1	114
Figure 44 : Les activités enzymatiques de KAP1 et son recrutement génique par les facteurs de transcription KRAB-ZNF	117
Figure 45 : Structure de la protéine CTIP2	121
Figure 46 : Représentation schématique de la régulation transcriptionnelle des gènes par CTIP2	123
Figure 47 : Modèle hypothétique de la latence du VIH-1 médiée par KAP1	167

Liste des tableaux

Tableau 1 : Vue d'ensemble des essais cliniques de réactivation de la latence	93
Tableau 2 : Les motifs consensus des sites accepteurs SUMO	99
Tableau 3 : Propriétés biologiques et structurales des isoformes SENPs	101

Principales abréviations

5' UTR	5' Untranslated Region
7SK snRNP	7SK small nuclear ribonucleoprotein
aa	Amino acid
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
AFF	AF4/FMR2 family member 1
ALIX	Apoptosis Linked gene 2 Interacting protein X
ANT	Adenine Nucleotide Transporter
AP1/2	Activator Protein 1/2
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA-Editing enzyme Catalytic polypeptide-like 3G
ARF	Alternative Reading Frame
ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
BAF180	BRG1-Associated Factor 180 kDa
BAX	BCL2 Associated X, apoptosis regulator
BBB	Blood–Brain Barrier
BBC3	BCL2 Binding Component 3
BCL11b	B Cell Leukemia 11b
Bcl-2	B-Cell Lymphoma
BMI1	B lymphoma Mo-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Insertion region 1 homolog
Brd4	Bromodomain containing protein 4
BRG1	Brahma-Related Gene-1
BST-2	Bone marrow stromal antigen 2
CA	Capside
CARM-1	Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1
CBC	Cap Binding Complex
CBF1	C-repeat Binding Factor 1
CBP	CREB Binding Protein
CBX4	Chromobox protein homolog 4
CCL19	C-C Motif Chemokine Ligand 19
CCR5	Chemokine (CC motif) Receptor 5

CDK9	Cyclin Dependent Kinase 9
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid
CHD3/4	Chromodomain Helicase DNA binding protein 3/4
Chk	Checkpoint kinase
CHMP1/2/4	Charged Multivesicular body Protein 1/2/4
CPSF6	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 6
CREB	C-AMP Response Element Binding protein
Crm1	Chromosome maintenance region 1
CTCF	CCCTC-binding Factor
CTD	C-Terminal Domain
CTIP2	Coup-TF (Chicken ovalbumin upstream promoter Transcription Factors) Interacting Protein 2
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
CXCR4	Chemokine (CXC motif) Receptor 4
dCA	Didehydro-Cortistatin A
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DDX3	DEAD Box Helicase 3
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNA-PKcs	DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	Deoxynucleoside Triphosphate
DSIF	DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) Sensitivity Inducing Factor
eIF4G	Eukaryotic Initiation Factor 4G
ELL	Elongation factor for RNA polymerase II
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
FACT	Facilitates Chromatin Transcription
fDC	Follicular Dendritic Vells
FGFβ	Fibroblast Growth Factor beta
FSS	Frameshift Stimulatory Signal
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue

gp120/41	Glycoprotéine 120/41
HAART	Highly Active Anti-Retroviral Therapy
HAND	HIV-Associated Neurocognitive Disorder
HAT	Histone Acetyl Transferase
HDAC	Histone Deacetylase
Hdm2	Human double minute 2
HEXIM1	Hexaméthylène bis-acétamide inducible 1
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1
HMT	Histone Methyl Transferase
HP1	Heterochromatin Protein 1
HTLV-1	Human T-Lymphotropic Virus type 1
HUSH	Human Silencing Hub
IFN	Interferon
IN	Intégrase
Ing-B	Ingenol-B
INI1	Integrase Interactor 1
IRES	Internal Ribosome Entry Site
IRF7	Interferon Regulatory Factor 7
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
KAP1	KRAB (Krüppel-Associated Box) domain-Associated Protein 1
KIR	Killer cell Immunoglobulin-like Receptor
KLF4	Krüppel Like Factor 4
KMT7	Lysine methyltransferase 7
KRAB-ZFPs	Krüppel-Associated Box Zinc Finger Proteins
LANA	Latency-Associated Nuclear Antigen
LARP7	Lupus Antigen Related Protein 7
LEF1	Lymphoid Enhancer binding Factor 1
LMP1	Latent Membrane Protein 1
LPA	Latency Promoting Agents
LPS	Lipopolysaccharides
LRA	Latency Reversing Agent
LRP	Lipoprotein Receptor-related Protein

LSD1	Lysine-Specific histone Demethylase 1A
LSF	Late SV40 Factor
LTNP	Long-Term Non-Progressors
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrice
MAGE	Melanoma-associated antigen family
MBD	Methyl-CpG-Binding Domain proteins
MCM	Minichromosome Maintenance
MePCE	Methylphosphate Capping Enzyme
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP-1β	Macrophage Inflammatory Protein 1 beta
miRNA	Micro Ribonuclei acid
MLV	Murine Leukemia Virus
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MTA	Metastasis Associated
NC	Nucléocapside
NCOR1	Nuclear receptor corepressor 1
Nef	Negative regulatory factor
NELF	Negative Elongation Factor
NEMO	NF- κ B Essential Modulator
NES	Nuclear Export Signal
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-κB	Nuclear Factor- κ B
NLS	Nuclear Localization Sequence
NNRTI	Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor
NO	Nitric oxide
NPC	Nuclear Pore Complex
NRON	Non-protein coding RNA, repressor of NFAT
NRTI	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor
NSMCE2	Non-Structural Maintenance of Chromosomes Element 2
NUCKS1	Nuclear Ubiquitous Casein and cyclin-dependent Kinase Substrate 1
NuRD	Nucleosome Remodeling and Deacetylation

ORC	Origin of Replication Complex
ORF	Open Reading Frame
PABP	Poly(A)-Binding Protein
PARP1	Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
Pc2	Polycomb 2 homolog
PCAF	p300/CBP-Associated Factor
PD-1	Programmed cell Death 1
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PHD	Plant Homeo Domain
PI (4,5) P2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT
PIC	Pre-Integration Complex
PIKKs	Phosphoinositide 3 Kinase-like protein Kinases
PJA2	Praja RING finger ubiquitin ligase 2
PKR	Protein Kinase R
PMAIP1	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
PML	Promyelocytic Leukemia protein
PR	Protéase
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
PRKDC	Protein Kinase DNA-activated Catalytic polypeptide
PRMT6	Protein arginine methyltransferase 6
PSMD11	Proteasome 26S subunit, non-ATPase 11
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor b
RanBP	Ran (Ras-related nuclear protein 1) Binding Protein
RanGAP	Ran GTPase (Guanosine Triphosphate hydrolase) Activating Protein
RbAp46/48	Retinoblastoma binding protein 46/48
RBBP4/7	RB Binding Protein 4/7, chromatin remodeling factor
RBCC	RING finger, 2 B-box zinc fingers, Coiled-Coil region
Rev	Regulator of virion expression
RIT1	Radiation Induced Tumor suppressor gene 1
RNA	Ribonucleic acid

RNF	RING Finger protein
RT	Reverse transcriptase
RT	Transcriptase inverse
RTC	Reverse Transcription Complex
SAE1/2	Small Ubiquitin Like Modifier (SUMO) Activating Enzyme 1/2
SAHA	Suberoylanilide Hydroxamic Acid
SAMHD1	Sterile Alpha Motif domain and HD domain-containing protein 1
SEC	Super Elongation Complex
SENPs	Sentrin-specific Protéases
SETDB1	SET Domain Bifurcated 1
SIRT1	Sirtuin 1
SMARCA4/5	SWI/SNF-related Matrix-associated Actin-dependent Regulator of Chromatin subfamily A member 4/5
SMYD2	SET and MYND Domain-containing protein 2
SP1	Specificity Protein 1
SPI	SUMO Protease Inhibitors
STUbLs	SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases
SUMO	Small Ubiquitin-related Modifier
SUV39h1	Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TAFII250	TATA box binding protein Associated Factor RNA polymerase II 250 kDa
TAR	Transactivation Response element
Tat	Transactivator of Transcription
TCM	Central memory CD4 T cells
TCR	T Cell Receptor
TEM	Effector memory CD4 T cells
TGF	Transforming Growth Factor
TIF1β	Transcriptional Intermediary Factor 1 beta
Tip60	Tat interactive protein 60 kDa
TLR	Toll-Like Receptor
TNA	Naïve CD4+ T cells
Top2β	DNA Topoisomerase 2 Beta

TP53AIP1	Tumor Protein p53 regulated Apoptosis Inducing Protein 1
TRIAL	Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Induced Ligand
TRIM28	Tripartite Motif-containing protein 28
TRIM5α	Tripartite Motif 5 alpha
TRRAP	Transformation/Transcription Domain-Associated Protein
TSG101	Tumor Susceptibility Gene 101
TTM	Transitional Memory CD4 T cells
UBC9	Ubiquitin-Conjugating 9
UNG2	Uracil DNA Glycosylase 2
USP7	Ubiquitin Specific Peptidase 7
UTR	Untranslated region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vif	Viral infectivity factor
VISCONTI	Viro-Immunological Sustained Control after Treatment Interruption
VPA	Valproic Acid
Vpr	Viral protein r
Vps34	Phosphatidylinositol 3-kinase
Vpu	Viral protein u.
WDR5	WD Repeat-containing protein 5
WICH	WSTF (Williams Syndrome Transcription Factor)-ISWI Chromatin remodeling complex
XRCC5/6	X-Ray Repair Cross Complementing 5/6
YY1	Yin and Yang 1 protein
ZBRK1	Zinc finger and BRCA1 (Breast cancer type 1 susceptibility protein)-interacting protein with A KRAB domain 1

Généralités : le Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH-1

1- Histoire et découverte

Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), a été reconnu en tant que maladie émergente en 1981, suite au nombre croissant de jeunes homosexuels ayant succombé à des infections opportunistes inhabituelles et à des tumeurs malignes rares (Centers for Disease Control (CDC), 1981). Un rétrovirus, nommé virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), a, par la suite, été identifié en tant qu'agent responsable de l'une des maladies infectieuses les plus dévastatrices à avoir émergé dans l'histoire récente (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984). En plus du VIH-1, le VIH-2 est aussi reconnu comme un agent étiologique du SIDA. Toutefois, la prévalence géographique et la pathogénèse de ces deux rétrovirus diffèrent et le VIH-1 reste l'agent responsable de la pandémie mondiale (Vidya Vijayan et al., 2017). Les souches du VIH-1 ont été échantillonnées à travers le monde et il est, rapidement, apparu qu'il présente une hétérogénéité génétique extrêmement élevée. L'analyse de l'évolution de cette diversité a permis d'avoir un aperçu de l'histoire du virus.

Peu de temps après, des virus, appelés virus de l'immunodéficience simienne (SIV), ont été trouvés chez divers primates d'Afrique subsaharienne, y compris les singes verts africains, les mangabeys fuligineux, les mandrills, et les chimpanzés. De façon surprenante, ces virus semblaient être, largement, non pathogènes chez leurs hôtes naturels, en dépit du regroupement du SIV et du VIH dans une lignée phylogénétique unique dans le rayonnement des lentivirus. Ces constatations ont fourni la première preuve que le sida avait émergé à la fois chez les humains et les macaques, en raison d'infections croisées avec des lentivirus de différentes espèces de primates (Sharp and Hahn, 2011).

Il est devenu clair que l'épidémie du VIH était le résultat d'un transfert de virus infectant des primates en Afrique. Les chasseurs de viande de brousse ont, probablement, été les premiers à être infectés.

Les souches du VIH-1 peuvent être divisées en quatre groupes distincts dont la prévalence est différente. Le groupe M, le seul largement répandu dans le monde et responsable de la pandémie mondiale. Le groupe O a été découvert en 1990, et est beaucoup moins répandu que le groupe M ; il est restreint au Cameroun, au Gabon et aux pays voisins (Gürtler et al., 1994; Peeters et al., 1997). Le groupe N, identifié en 1998, est encore moins répandu que le groupe O, avec seulement 13 cas d'infections documentés, tous situés au Cameroun (Simon et al., 1998; Vallari et al., 2010). Enfin, le groupe P a été découvert en 2009 chez une femme camerounaise vivant

en France (Plantier et al., 2009), et, jusqu'ici, une seule autre personne, également en provenance du Cameroun, a été diagnostiquée porteuse de ce nouveau groupe de VIH-1 (Vallari et al., 2011).

Il est maintenant bien établi que le VIH-1, de groupes M et N, a pour origine des souches de SIV du chimpanzé (SIVcpz) qui appartiennent à une lignée spécifique de sous-espèces, appelée SIVcpzPtt (Pan Troglodytes troglodytes) (Gao et al., 1999; Keele et al., 2006). Les analyses phylogénétiques montrent que les groupes O et P se rapprochent des virus simiens des gorilles (SIVgor) (Neel et al., 2010).

2- Epidémiologie

En 2016, 36,7 millions de personnes vivaient avec le VIH, alors qu'elles étaient 33,3 millions en 2010. Bien que de nouveaux cas aient été signalés dans toutes les régions du monde, environ les deux tiers sont en Afrique subsaharienne, avec 46% de nouveaux cas en Afrique orientale et australe. L'incidence annuelle a, relativement, diminué, passant de 2,6 millions en 2005 à 1,8 millions en 2016 (données ONUSIDA).

La plupart des infections sont transmises hétérosexuellement, bien que les facteurs de risques varient. Dans certains pays, les hommes qui ont des rapports sexuels avec des hommes, les consommateurs de drogues injectables, les travailleurs du sexe, les transgenres et les détenus sont affectés de manière disproportionnée. Bien que la capacité de dépistage ait augmenté au fil du temps, environ 4 personnes sur 10 ne savent toujours pas qu'elles sont séropositives.

Le VIH a entraîné une résurgence de la tuberculose, particulièrement en Afrique, qui est une des principales causes de décès chez les personnes vivant avec le VIH dans le monde. Bien que les décès par la tuberculose chez les personnes vivant avec le VIH aient diminué, en 2015, environ 11% de nouveaux cas sont survenus.

Les femmes représentent la moitié (51%) de tous les adultes vivant avec le VIH dans le monde. Les inégalités entre les sexes, l'accès différent aux services et la violence sexuelle augmentent la vulnérabilité des femmes au VIH. Les jeunes âgés de 15 à 24 ans représentent environ un tiers des nouvelles infections par le VIH. En 2016, à l'échelle mondiale, il y avait 2,1 millions d'enfants vivant avec le VIH.

Cependant, l'élargissement de l'accès au traitement antirétroviral a permis de changer considérablement l'épidémiologie mondiale de l'infection par le VIH. Le nombre de personnes vivant avec le VIH, sous traitement antirétroviral a atteint 20,9 millions de personnes en 2017. Il a été observé que la mortalité par le VIH a diminué, passant de 1,8 million de décès en 2005 à 1 million de décès en 2016.

Généralités : le Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH-1

De nombreuses procédures pour lutter contre le VIH existent telles que des campagnes de prévention efficaces comprenant des programmes de changement de comportement, la distribution de préservatifs, le dépistage du VIH, la sécurité de l'approvisionnement en sang, et la circoncision masculine.

L'ONUSIDA démontre l'augmentation du nombre de personnes vivant avec le VIH sous traitement antirétroviral, et souligne ainsi les énormes gains réalisés jusqu'à présent. Environ, 38% des personnes vivant avec le VIH ont une charge virale supprimée. Pour prévenir la transmission du VIH mère-enfant, le pourcentage de femmes enceintes recevant des traitements antirétroviraux (HAART : Highly Active Antiretroviral Therapy) a été augmenté à 77% en 2015. L'accès à la HAART chez les enfants a, également, augmenté de façon significative, passant de 21% en 2010 à 49% en 2015.

De plus, des recherches récentes ont montré que le traitement des personnes vivant avec le VIH réduit, considérablement, le risque de transmission à leurs partenaires négatifs. La prophylaxie antirétrovirale par préexposition (PrEP : Pre-exposure antiretroviral prophylaxis) a été démontrée comme une stratégie efficace de prévention du VIH chez les personnes à haut risque d'infection (recommandation de l'OMS). En 2015, l'OMS a recommandé la PrEP comme forme de prévention pour les personnes à haut risque, en combinaison à d'autres méthodes de prévention.

D'énormes progrès sont, continuellement, réalisés, avec de nouveaux défis à relever à l'échelle mondiale pour lutter contre l'épidémie. Unaid a lancé une stratégie ambitieuse nommée 90-90-90 qui envisage à ce qu'à l'horizon 2020 :

- 90% des personnes vivant avec le VIH connaissent leur statut sérologique.
- 90% de toutes les personnes infectées par le VIH dépistées reçoivent un traitement anti rétroviral durable.
- 90% des personnes recevant un traitement antirétroviral ont une charge virale durablement supprimée.

La recherche doit continuer à se développer de façon à fournir de nouvelles thérapies visant à progresser vers une guérison des patients et permettre l'éradication du virus.

3- Description de la particule virale

3.1- Morphologie du virion mature

Le VIH est un membre du genre lentivirus, qui comprend des rétrovirus à génomes complexes. Les particules virales, (figure 1), ont une taille de 80 à 120 nm et un core en forme de cône,

Généralités : le Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH-1

appelé capsid. Ce virus est enveloppé dans une bicouche lipidique, dérivée des membranes de la cellule hôte. Exposées à la surface, on retrouve les glycoprotéines gp120, qui sont ancrées via leur interaction avec les glycoprotéines transmembranaires gp41. La bicouche lipidique contient, également, plusieurs protéines membranaires, dérivées de la cellule hôte tels que les antigènes majeurs d'histocompatibilité, l'actine et l'ubiquitine. La face interne de l'enveloppe est tapissée par une matrice qui contient 2000 copies de la protéine matrice (MA, p17) et un core conique, appelé capsid, qui contient 2000 copies de la protéine capsid (CA, p24) localisé au centre du virus. Au cœur de la particule virale, on retrouve encapsidés, 2 copies du génome viral non épissé et stabilisé sous la forme d'un complexe ribonucléoprotéique par 2000 copies de protéines de nucléocapsid (NC, p7), ainsi que 3 enzymes virales : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN) (pour revue (Ganser-Pornillos et al., 2008)). Les particules virales contiennent, également, des protéines virales dites accessoires Nef, Vif et Vpr et les protéines p1, p2 et p6. Les particules virales incorporent, également, la lysyl-tRNA³ (tRNA³^{lys}) cellulaire pour amorcer la transcription inverse et la synthèse du cDNA (Guo et al., 2003).

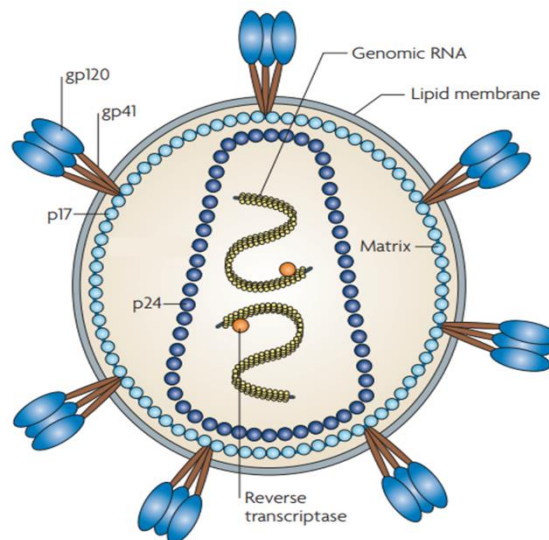


Figure 1 : Représentation schématique de la particule du VIH-1 (Karlsson Hedestam et al., 2008).

3.2- Organisation du génome viral

Les particules virales sont constituées chacune de 2 brins d'RNA de polarité positive d'environ 9,7 kb. Le génome du VIH-1 contient 9 cadres ouverts de lecture (ORF : Open Reading Frame), situés au milieu, qui produisent 15 protéines (Frankel and Young, 1998). Ces séquences codantes sont flanquées, de part et d'autre, par des séquences régulatrices non codantes en 5' et 3'.

Généralités : le Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH-1

a- Les régions non codantes

Les régions codantes du génome sont entourées par des régions non codantes en 5' et 3', appelées UTR (untranslated region), (figure 2).

La séquence en 5' est composée des régions suivantes :

- Une coiffe, qui protège l'RNA viral de la dégradation.
- La région R (Répétée), qui contient 2 motifs en tige-boucle, impliqués dans la transcription des gènes viraux. Le premier motif est dénommé : la TAR (Transactivation Response element) qui est importante à la transactivation des gènes viraux médiée par la protéine régulatrice du VIH-1, Tat (Transactivator of Transcription). Le 2^{ème} motif comprend un signal de polyadénylation (Roebuck and Saifuddin, 1999).
- La région U5 (Unique en 5').
- La région PBS (Primer Binding Site), importante pour l'initiation de la transcription inverse par recrutement du tRNA^{3^{lys}} (Jiang et al., 1993).
- Le site de dimérisation (DIS : Dimerization Initiation Site), qui contient une structure en tige boucle, également appelée « Kissing Loop », qui facilite l'incorporation des 2 RNA génomiques dans le virion (Laughrea et al., 1997; Paillart et al., 1997).
- Un site SD (Splice Donor Site), utilisé pour générer tous les mRNA épissés sous-génomiques.
- La région appelée Psi (Packaging signal ou Ψ), qui lie la NC, est indispensable à l'incorporation du RNA génomique dans le virion (Clever and Parslow, 1997).

La séquence UTR 3' comprend la région U3 (Unique en 3') et la séquence R, identiques à celles retrouvées en 5'.

Au sein des séquences codantes du génome viral RNA, on retrouve une séquence non codante, appelée RRE (Rev Responsive Element), qui est le site de fixation de la protéine virale régulatrice Rev, impliquée dans l'export nucléaire des transcrits viraux.

b- Les régions codantes

Les protéines virales sont issues des séquences codantes *gag* (Group specific antigen), *pol* (Polymerase), *env* (Envelope), dont l'expression permet la production des protéines structurales et enzymatiques.

Le gène *gag* code pour la polyprotéine Pr55 Gag qui va être clivée par la protéase virale pour donner naissance aux protéines de matrice, capsid, nucléocapsid, p1, p2 et la protéine p6 (Henderson et al., 1990).

Généralités : le Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH-1

Le gène *env* code pour une protéine précurseur la gp160 glycosylée, qui sera clivée par la protéase cellulaire (la furine) pour conduire aux glycoprotéines de l'enveloppe virale la gp120 et gp41 (Hallenberger et al., 1992).

Un décalage dans le cadre de lecture à l'extrémité 3' du gène *gag* conduit à la synthèse de la polyprotéine précurseur Pr160 Gag-Pol, dont le clivage conduit à la production des protéines MA, CA, p2, NC, p6 et des enzymes virales sous forme active : la PR, la RT et IN (pour revue (Hill et al., 2005a)) .

Le génome code, également, pour des protéines régulatrices Tat et Rev (Regulator of virion expression) et les protéines accessoires Nef (Negative regulatory factor), Vif (Viral infectivity factor), Vpr (Viral protein r), Vpu (Viral protein u).

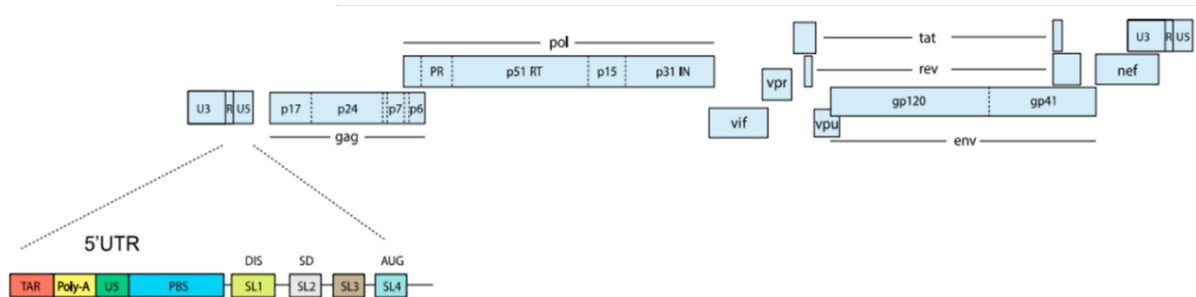


Figure 2 : Organisation du génome proviral du VIH-1. Le génome du VIH-1 contient plusieurs cadres de lecture codant pour les protéines structurales Gag, Env et pour les enzymes virales Pol. Il est flanqué à ses extrémités par les 5' et 3' LTR. Les autres cadres de lecture codent pour les protéines régulatrices Tat et Rev ou bien pour les protéines Vif, Vpr, Vpu et Nef (Mailler et al., 2016).

4- La réplication du VIH-1

Les cibles spécifiques du VIH-1 sont les cellules du système immunitaire : les lymphocytes T, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques ainsi que des cellules du système nerveux central : les astrocytes et les cellules microgliales. Les principales étapes du cycle de réplication du VIH-1 sont présentées dans la figure 3. La phase précoce commence par la reconnaissance de la cellule cible par le virion mature, elle est suivie par tous les processus conduisant à l'intégration du DNA génomique dans le chromosome de la cellule hôte. La phase tardive commence par l'expression régulée du génome proviral intégré, et implique tous les processus jusqu'au bourgeonnement et la maturation du virus.

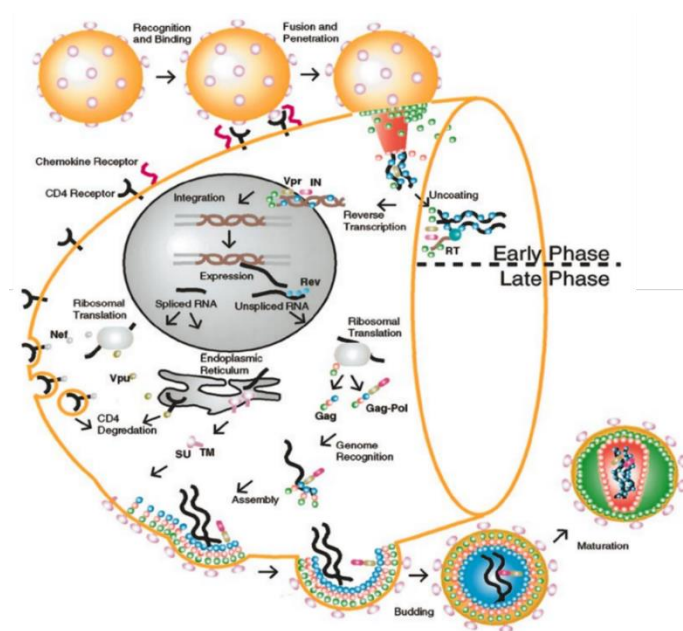


Figure 3 : Caractéristiques générales du cycle de réplication du VIH-1. La phase précoce (partie supérieure du diagramme) commence par la reconnaissance du CD4 et implique des événements allant jusqu'à l'intégration du DNA proviral. La phase tardive inclut tous les événements allant de la transcription du DNA intégré au bourgeonnement et à la maturation du virus (Turner and Summers, 1999).

4.1- La phase précoce

4.1.1- L'entrée du virus

L'entrée du virus dans la cellule peut être décomposée en trois étapes successives (figure 4) :

- L'interaction du virus avec le récepteur spécifique CD4.
- L'interaction avec les corécepteurs (CCR5 ou CXCR4).
- La fusion de la membrane du virus avec celle de la cellule infectée ou l'endocytose du virus.

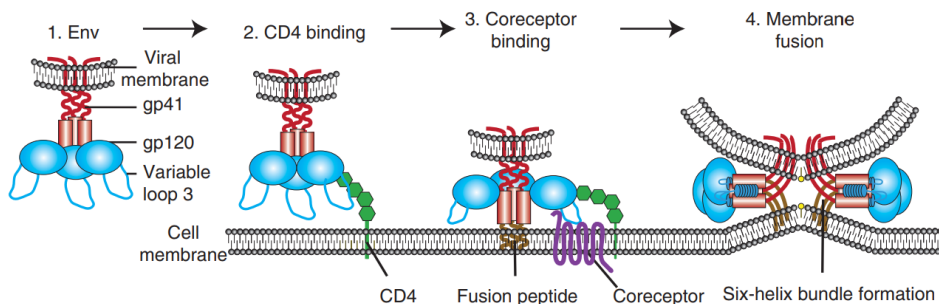


Figure 4 : Mécanisme d'entrée du VIH-1 (Wilén et al., 2012).

a- Fixation au récepteur CD4

La gp120 des particules de VIH-1 se lie par l'intermédiaire d'interactions spécifiques au domaine d'immunoglobuline amino-terminal du récepteur CD4 des cellules immunitaires. Lors

de la liaison à CD4, la gp120 subit un changement conformationnel permettant des interactions supplémentaires avec des corécepteurs, (figure 4).

Un des principaux paramètres pouvant affecter l'efficacité de cette étape est la densité des récepteurs CD4, présents à la surface de la cellule cible, mais aussi l'état d'activation des cellules immunitaires (Platt et al., 1998). Par exemple, les macrophages ont des niveaux d'expression CD4, qui sont 10 à 20 fois plus faibles que dans les lymphocytes T CD4 (Kazazi et al., 1989; Mariani et al., 2011). Pour ces raisons, il existe une grande variabilité de l'efficacité de l'infection en fonction, à la fois, de la souche du virus et du type de cellules infectées.

Le VIH-1 ne se lie pas, uniquement, au CD4. Des récepteurs alternatifs peuvent permettre l'entrée du virus dans la cellule hôte tels que les récepteurs du mannose des macrophages (Larkin et al., 1989), et DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) des cellules dendritiques (Geijtenbeek et al., 2000).

b- Fixation au co-récepteur

Les principaux corécepteurs du VIH-1 sont CCR5 (Chemokine (CC motif) Receptor 5) et CXCR4 (Chemokine (CXC motif) Receptor 4) (Deng et al., 1996), (figure 4). L'utilisation des corécepteurs définit le tropisme viral de la souche infectante. La boucle V3 de la gp120 joue un rôle majeur dans la détermination de ce tropisme (O'Brien et al., 1990). Les virus utilisant CCR5 sont appelés R5, ceux qui utilisent CXCR4 sont nommés X4, tandis que ceux faisant appel aux deux sont appelés R5X4. Ainsi, l'entrée virale ne dépend pas seulement de la densité de la membrane en CD4, mais, également, de celle de ses corécepteurs.

Le tropisme R5 est prévalent pendant la phase aiguë et chronique de l'infection. Néanmoins, après plusieurs années, en l'absence de traitement et pour la moitié des patients, des variants capables d'utiliser CXCR4 apparaissent et sont associés au progrès rapide vers un état pathologique (Verhofstede et al., 2012). Des travaux ont rapporté que les sujets présentant la délétion de 32 paires de bases dans le promoteur du gène CCR5, dénommés CCR5 Δ 32, qui conduit à la perte complète d'expression du CCR5, sont résistants à l'infection par le VIH (Liu et al., 1996).

c- La fusion membranaire

La liaison au récepteur et au corécepteur conduit à des changements conformationnels de la gp120 qui induit l'exposition du peptide de fusion de la gp41, qui s'insère dans la membrane de la cellule hôte (figure 4). A ce stade, la membrane virale et la membrane cellulaire sont assez proches pour former le pore de fusion qui conduit au transfert de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule (Blumenthal et al., 2012).

Il est à noter que l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible peut, également, se produire par endocytose, suivie d'une fusion avec les endosomes. Ce procédé a été proposé comme prédominant dans l'internalisation du VIH dans les macrophages ou les astrocytes (Carter et al., 2011; Chauhan et al., 2014).

L'étape limitant la vitesse de l'infection virale est l'attachement à la cellule hôte. Dans certains cas, le transfert du virus d'une cellule à une autre est un processus spécialisé comme dans le cas des cellules dendritiques (DC) (figure 5). Les DC sont capables de répandre l'infection par la création de « synapses virologiques » avec les lymphocytes T CD4⁺ agissant comme facteur de dissémination du virus. Chaque DC peut se lier à plusieurs centaines de virions via la lectine DC-SIGN, exprimée à sa surface (McDonald et al., 2003; Turville et al., 2002). Les virions sont endocytés dans un compartiment résistant à la trypsine. Après liaison de la DC à une cellule T, le virus internalisé migre vers l'interface DC/cellule T formant la synapse virologique. Lorsque les lymphocytes T rencontrent la DC, ils déploient des filopodes enrichis en récepteurs CD4 et corécepteurs dans les compartiments invaginés de la DC, riches en virions. Ainsi, le virus peut se lier efficacement au lymphocyte T et entrer dans la cellule (Hübner et al., 2009; McDonald et al., 2003).

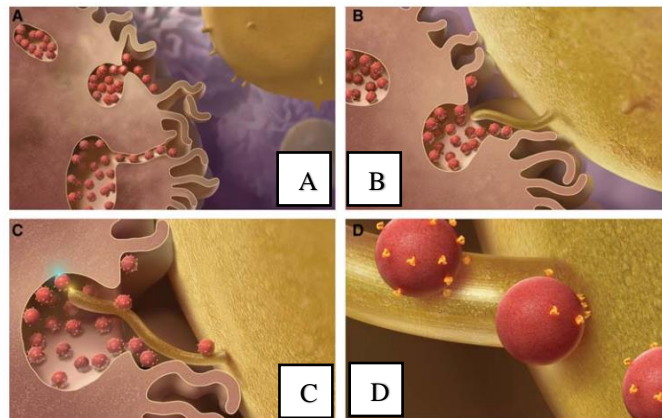


Figure 5 : Modèle d'infection des cellules T par les DC. (A) Les DC captent et concentrent les virions. (B) Des lymphocytes T CD4⁺, contenant des protrusions membranaires, lient les DC. (C) Les protrusions des lymphocytes T CD4⁺ envahissent les compartiments contenant le virus et lient efficacement le VIH. (D) Le virus migre alors vers le corps cellulaire pour déclencher l'infection (Wilen et al., 2012).

4.1.2- La décapsidation et la transcription inverse

La décapsidation est considérée comme le processus par lequel le core viral se dissocie du complexe de transcription inverse (RTC : Reverse Transcription Complex) (Aiken, 2006). Le RTC comprend le RNA génomique lié aux protéines RT, NC, MA, CA, Vpr et IN.

De précédents modèles avaient proposé que la capsid reste intacte pendant un certain temps après l'entrée. La décapsidation se produirait progressivement pendant le transport vers le noyau

et la transcription inverse (Warrilow et al., 2009). D'autres études ont, ensuite, suggéré que la CA reste associée au RTC, suite à sa translocation dans le noyau (Zhou et al., 2011).

Le modèle qui est privilégié, propose que les capsides restent intactes et interagissent avec le réseau d'actine pour se diriger vers la membrane nucléaire, la transcription inverse commence durant ce trajet (Campbell et al., 2004). Les RTC transitent des microtubules vers les filaments d'actines et entrent en contact avec les pores nucléaires (Arhel et al., 2006a). La décapsidation se produit au niveau du pore nucléaire à la fin de la transcription inverse, (figure 6). Une étude montre qu'elle est déclenchée après le transfert du premier brin de transcription inverse (Cosnefroy et al., 2016). Ce modèle présente la capside du VIH-1 comme une structure importante pour maintenir la stœchiométrie de la RT du VIH-1 par rapport au génome viral pendant la transcription inverse. Le maintien de cette stœchiométrie est essentielle pour contrer la dilution du génome dans le cytoplasme qui réduit, significativement, l'efficacité de la transcription inverse (pour revue (Arhel, 2010)).

La décapsidation et la RT sont des phénomènes liés. Une inhibition de la transcription inverse induit un retard de décapsidation (Yang et al., 2013a), de même que les virus avec un core instable présentent une transcription inverse inefficace (Forshey et al., 2002).

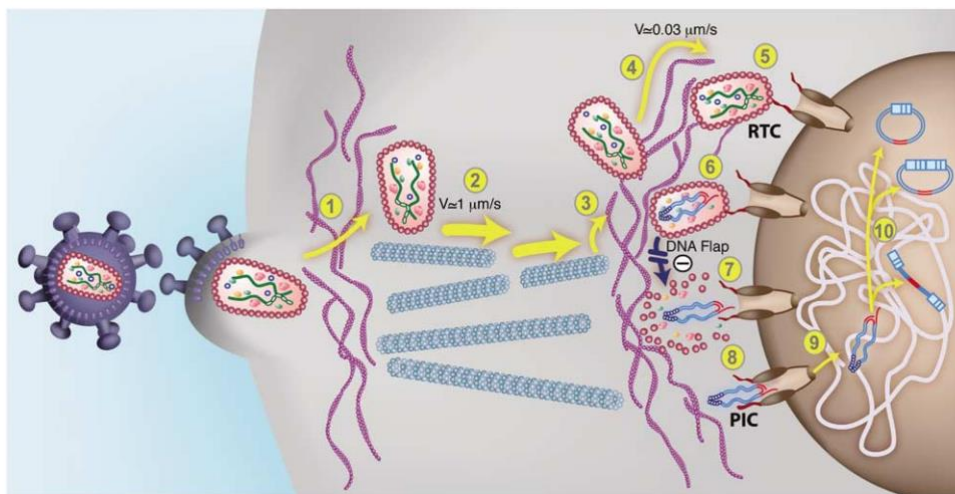


Figure 6 : Migration du RTC vers le noyau et décapsidation. Après entrée du core viral dans la cellule, le RTC est transporté au niveau de la membrane nucléaire à travers le réseau de microtubules. La capside se fixe au NPC (Nuclear Pore Complex) et le RTC réalise la transcription inverse conduisant à la synthèse du DNA viral et du DNA flap. La capside est, ensuite, déstabilisée par la maturation du RTC en PIC (complexe de préintégration) (Arhel et al., 2007).

a- La transcription inverse

Le VIH-1 utilise la RT pour convertir son génome RNA monocaténaire en DNA bicaténaire (figure 7).

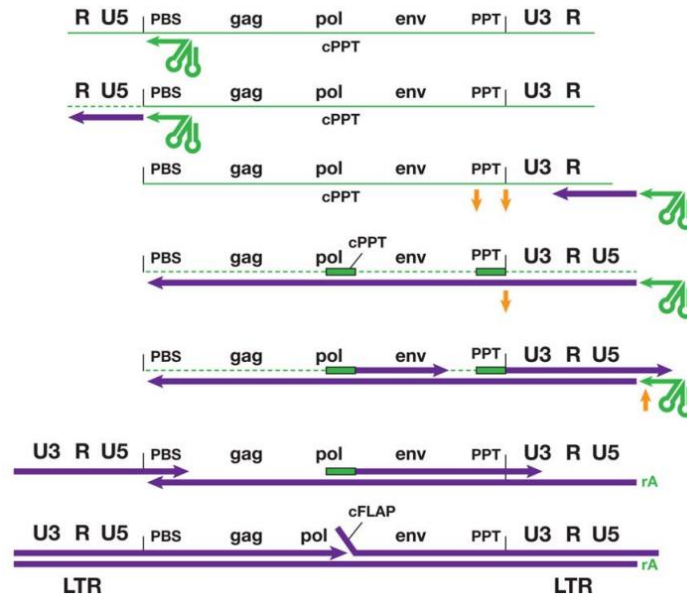


Figure 7 : Illustration des différentes étapes de transcription inverse. Les séquences des RNA et tRNA^{3lys} sont représentées en traits verts. Les séquences de DNA en violet. Les traits en pointillés représentent les séquences dégradées par la RNase H (Hughes, 2015).

La RT est un hétérodimère, composé de 2 sous-unités. La p66 possède un rôle catalytique avec un site actif pour 2 activités enzymatiques : DNA polymérase et RNase H, tandis que la p51 joue un rôle structural. On retrouve 80 à 120 copies de RT par capsid.

Comme illustré dans la figure 7, la transcription inverse commence par l'hybridation au tRNA^{3lys} lié à la séquence PBS de l'extrémité 5' non codante du RNA viral génomique et sert de matrice pour la synthèse du DNA correspondant aux régions U5 et R. L'activité RNase H de la RT hydrolyse l'extrémité 5' du RNA complémentaire du brin de DNA nouvellement synthétisé, puis il se produit un saut de brin où le DNA néosynthétisé, est transféré à la région R de l'extrémité 3' du RNA viral et va servir de matrice pour la synthèse du DNA (-) (Minus-strand DNA).

A ce stade, la synthèse du DNA (-) se poursuit jusqu'à la région PBS de l'extrémité 5' du RNA génomique, qui est dégradé au fur et à mesure par la RNase H, à l'exception des sites cPPT (central polypurine tract) et 3'PPT (3' polypurine tract) riches en purines. Ces séquences servent d'amorce pour la synthèse du brin de DNA plus (+). Le tRNA^{3lys}, les séquences cPPT et 3'PPT sont, ensuite, dégradée par la RNase H, il s'ensuit un 2^{ème} saut de brin qui permet à la région PBS du brin de DNA (+) de s'hybrider avec la région PBS du brin de DNA (-). La synthèse du brin de DNA (+) se termine avec un déplacement de brin d'une centaine de nucléotides par la RT au niveau de la région CTS (Central Termination Signal).

La transcription inverse conduit à la synthèse de DNA double brin linéaire contenant un recouvrement interne appelé DNA flap, et 2 séquences identiques aux extrémités contenant

Généralités : le Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH-1

chacune U3, R et U5 qui constituent le LTR (Long Terminal Repeat) (pour revue (Götte et al., 1999; Hu and Hughes, 2012).

Les séquences du VIH-1 varient considérablement. La diversité des séquences virales survient, rapidement, chez les patients après l'infection. Les mutations qui surviennent pendant le cycle de réplication constituent la source majeure de diversité virale (Coffin, 1995). La RT est une enzyme peu fidèle, qui conduit à l'apparition de nouveaux recombinants de DNA viral. Ainsi, le taux important de recombinaisons génétiques et les mutations produites par la RT conduisent à une population de virus très hétérogène capable d'échapper au système immunitaire et de résister aux traitements (Mansky and Temin, 1995).

b- La décapsidation

La décapsidation reste un mécanisme encore mal compris. Il n'a été décrit qu'après l'achèvement de la RT et la formation de DNA flap. Les RTC subissent une maturation qui est dépendante du DNA flap, conduisant à la formation du complexe de préintégration (PIC). Ce tout dernier événement agit comme l'élément favorisant la décapsidation du VIH-1 au niveau du pore nucléaire (Arhel et al., 2007).

c- L'import nucléaire

Le PIC du VIH-1 pénètre dans le nucléoplasme en passant par les complexes des pores nucléaires (NPC) qui forment des canaux stables à travers l'enveloppe nucléaire, (figure 8). Le PIC contient, à la fois, des protéines d'origine virale (MA, NC, IN, Vpr) et cellulaire (LEDGF / p75 (lens epithelium-derived growth factor/transcriptional co-activator p75), HMGA1 (High mobility group protein A1), BAF (Barrier to autointegration factor)).

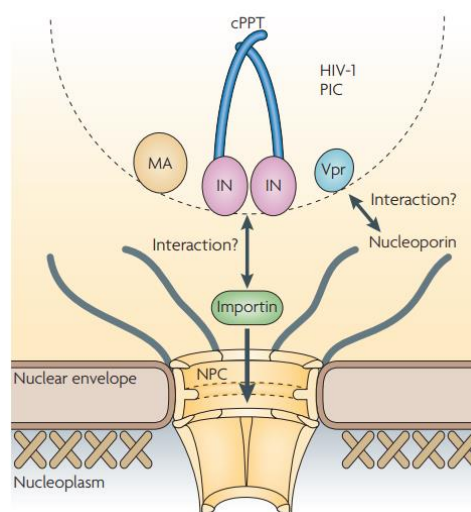


Figure 8 : Import nucléaire du PIC. Les constituants du PIC : MA, Vpr, IN, et du DNA flap sont des facteurs caryophiles qui interagissent avec les importines et les nucléoporines, afin de faciliter le transport à travers le NPC (Suzuki and Craigie, 2007).

d- Les facteurs viraux impliqués dans l'import nucléaire du PIC

La capsidie interagit avec RanBP2 (également connu sous le nom de NUP358) pour ancrer le virion au NPC (Schaller et al., 2011).

La MA a été proposée comme un des premiers composants du PIC à avoir un rôle dans l'import nucléaire de par la présence d'une séquence de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization Sequence) (von Schwedler et al., 1994). Cependant, il a été démontré que les virus conservent encore un faible niveau de réplication après délétion de la matrice, ce qui a permis d'exclure l'entière contribution de la matrice comme seul facteur impliqué dans l'import nucléaire (Reil et al., 1998).

Vpr régule l'import nucléaire des PIC du VIH-1 en se liant à l'importine α et en augmentant son affinité pour les NLS de MA, ce qui facilite la fixation et le déplacement du PIC à travers le NPC (Popov et al., 1998).

L'intégrase (IN), qui est essentielle à l'intégration du DNA, a été impliquée dans l'import nucléaire du PIC du VIH-1. La voie de l'importine a été proposée pour servir de médiateur au transport de l'IN dans le noyau (Gallay et al., 1997). L'IN contient, également, des séquences NLS nécessaires à son accumulation avec les PIC dans le noyau (Bouyac-Bertoia et al., 2001). Enfin, plusieurs travaux soulignent l'importance du DNA flap dans l'import nucléaire du PIC. En effet, la mutation du cPPT empêche la formation du DNA flap, avec, pour conséquence, une faible réplication virale attribuée à une diminution d'entrée du cDNA dans le noyau (Arhel et al., 2006b; De Rijck and Debyser, 2006).

e- Les facteurs cellulaires impliqués dans l'import nucléaire

Différentes protéines cellulaires participent à l'import nucléaire du VIH-1 : les importines, les nucléoporines : RanBP2 et NUP153, la transportin 3 (TNPO3) et LEDGF/p75. Une étude récemment publiée, a montré que l'interaction des protéines de capsides avec le facteur cellulaire CPSF6 (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 6) permet le trafic intranucléaire du PIC en vue d'orienter l'intégration virale dans des régions géniques denses d'euchromatine (Achuthan et al., 2018).

Plusieurs composants du PIC du VIH-1, tels que les protéines MA, Vpr et IN, interagissent avec des membres de la famille des importines α (Gallay et al., 1997; Popov et al., 1998). Elles forment un hétérodimère avec l'importine- β , qui transporte des molécules cargo contenant un NLS à travers l'enveloppe nucléaire (Gallay et al., 1996). Après fixation au NPC, le complexe importin-cargo-protéine est transporté dans le noyau de façon énergie dépendante.

RanBP2 et NUP153 sont localisés respectivement aux extrémités cytoplasmique et nucléaire du NPC et constituent des sites de fixation pour des molécules qui traversent le NPC. La

cyclophiline A (CYPA) se lie à la capsidie et dirige le VIH-1 vers une voie d'entrée nucléaire, qui implique RanBP2, qui va ancrer le PIC sur le côté cytoplasmique du NPC (Schaller et al., 2011). NUP153 contribue à l'import du PIC par son interaction avec la protéine de capsidie (Schaller et al., 2011). RanBP2 et NUP153 agissent en synergie car la déplétion de l'une ou l'autre de ces protéines diminue l'import nucléaire (Schaller et al., 2011).

LEDGF/p75 est un régulateur transcriptionnel qui s'associe à l'IN (Cherepanov et al., 2003) et la protège d'une dégradation par le protéasome (Llano et al., 2004). Ce facteur contient une séquence NLS et augmente l'efficacité de l'import nucléaire de l'IN (Vanegas et al., 2005).

4.1.3- L'intégration du génome viral

Après avoir traversé le NPC, le PIC atteint la périphérie du noyau, qui est un environnement complexe et hétérogène fournissant des sites d'ancrage dans les chromosomes. L'intégration du DNA viral dans le chromosome est catalysée par l'intégrase. Cette enzyme réalise deux réactions enzymatiques essentielles : une réaction de clivage enzymatique aux extrémités 3' du DNA viral et une réaction de transfert de brin, (figure 9). Cette activité de l'intégrase commence peu après la synthèse du DNA viral. Dans le PIC, l'intégrase se multimérise sur le DNA naissant pour former le complexe intégrase-DNA viral, appelé l'intasome, qui consiste en un tétramère de la sous-unité d'intégrase (Hare et al., 2010). Une sous-unité de chaque dimère d'intégrase se lie au DNA viral et élimine deux nucléotides GT des extrémités 3' LTR et génère des extrémités CAO_H-3'-hydroxyle (Hare et al., 2012; Pauza, 1990).

Après l'import nucléaire, l'intasome s'accroche au DNA cible. L'intégrase utilise les groupes 3'-OH sur les extrémités du DNA viral et les joint aux phosphates 5' aux extrémités du DNA cible (Engelman et al., 1991). L'étape finale de la réaction d'intégration est réalisée par les enzymes de réparation du DNA. Elles permettent le clivage des nucléotides non associés et la réparation des lacunes entre le DNA cible et le DNA viral (Vincent et al., 1990; Yoder and Bushman, 2000).

Le VIH-1 s'intègre dans les régions de gènes à transcription active des lymphocytes T (Schröder et al., 2002). Il a été démontré que sur 74 sites d'intégrations, 93% se trouvaient dans des zones transcriptionnellement actives (Han et al., 2004).

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la détermination de l'efficacité et la sélection du site d'intégration. La plupart font partie du PIC tels que : LEDGF/p75, HMGA1 et BAF.

LEDGF contient en C-terminal un site de liaison à l'intégrase (IBD : Integrase Binding Domain). Par son domaine N-terminal, elle protège et oriente l'intégration du VIH-1 dans les régions de gènes actifs, fortement épissés et riches en introns (Singh et al., 2015).

HMGA1 peut interagir avec le DNA viral, mais pas avec l'intégrase ; elle contribue à amener les extrémités du DNA viral dans l'intasome (Farnet and Bushman, 1997).

BAF interagit avec le DNA viral pour le compacter et prévenir l'auto-intégration prématurée (Lee and Craigie, 1994). Un autre facteur cellulaire INI1 (Intégrase Interactor 1), membre du complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine, interagit directement avec l'intégrase, afin de la maintenir dans une conformation stable qui empêche l'auto-intégration (Maillot et al., 2013).

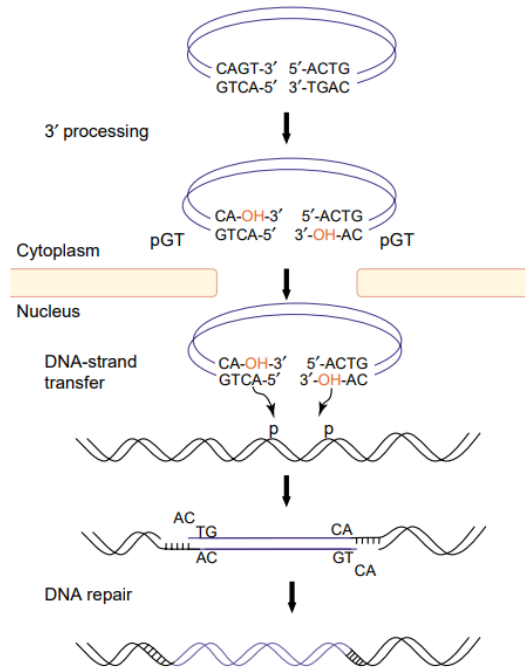


Figure 9 : Mécanisme d'intégration du génome viral du VIH-1 (Van Maele et al., 2006).

4.2- La phase tardive

4.2.1- Expression du DNA viral intégré

Une fois que le VIH-1 est intégré dans le génome de l'hôte, le provirus entame un cycle productif d'infection ou, dans de rares cas, devient latent. Le devenir du provirus est déterminé par l'activité transcriptionnelle induite par le promoteur viral le LTR 5'. L'activité basale du promoteur VIH-1 est sous le contrôle de mécanismes cellulaires, qui activent ou répriment la transcription. Cependant, contrairement aux gènes cellulaires, la transcription du VIH-1 est fortement renforcée par Tat, un transactivateur puissant, codé par le virus lui-même.

4.2.1.1- Structure du promoteur viral

La transcription du VIH-1 commence à l'extrémité 5' du LTR, qui contient les régions U3, R et U5. Le LTR est divisé en quatre domaines fonctionnels : une région régulatrice (de -454 à -104 nucléotides avant le site d'initiation de la transcription), un élément Enhancer (nucléotides -105 à -79), la région du promoteur minimal (nucléotides -78 à -1) et la région TAR (nt +1 à

Généralités : le Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH-1

+60). Les trois premiers sont trouvés dans U3, tandis que la TAR est trouvée dans la région répétée (R), (figure 10) (Quivy and Lint, 2002; Stevens et al., 2006).

- La région régulatrice contient des sites de liaison pour des facteurs de transcription, tels que le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT) et COUP-TF.
- La région Enhancer consiste en deux sites de liaison en tandem pour le facteur de transcription NF-kB.
- Le promoteur minimal comprend un motif TATA et trois sites de liaison à la protéine de spécificité 1 ou Sp1, répétés en tandem.
- La région TAR permet la formation d'une structure RNA stable en tige-boucle nécessaire à l'activation transcriptionnelle, médiée par Tat.
- En aval de la région TAR on retrouve des sites importants pour la fixation de facteurs de transcription tels qu'AP1, NFAT, IRF et Sp1.

Indépendamment du site d'intégration virale, le promoteur proviral est organisé en 2 nucléosomes, positionnés de façon invariable : nuc-0 (-415/-255), nuc-1 (+10/+155), qui sont séparés par deux régions intermédiaires hypersensibles à la digestion par la nuclease HS-1 et HS-2. Ces dernières sont dépourvues de nucléosomes et contiennent les sites de liaison pour de multiples régulateurs de transcription. Nuc-0 limite l'accès des régions régulatrices aux facteurs de transcription. Au niveau du promoteur latent, nuc-1 bloque la transcription, en empêchant le passage de la polymérase (Rafati et al., 2015; Steger and Workman, 1997; Verdin et al., 1993).

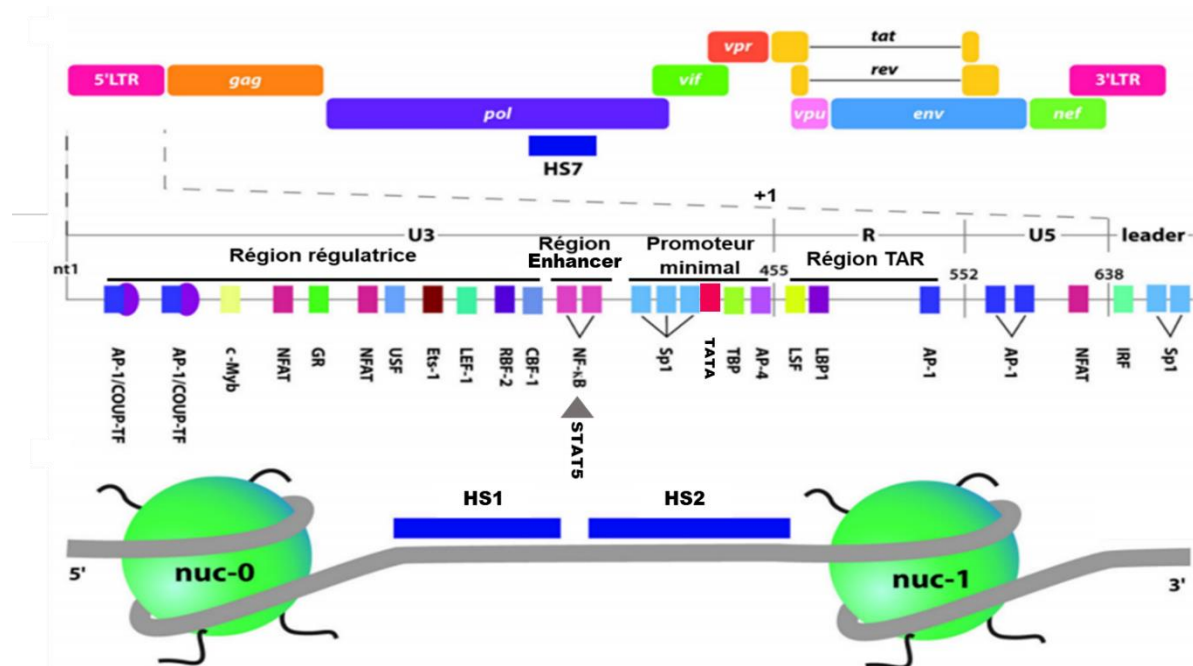


Figure 10 : Organisation schématique de l'extrémité 5' du Promoteur du VIH-1, après transcription inverse et intégration (Colin and Van Lint, 2009a).

4.2.1.2- Transcription du VIH-1

La transcription se fait en 2 phases : une phase précoce, indépendante du transactivateur viral Tat, et une phase tardive d'élongation de la transcription, qui est dépendante de Tat.

a- *Initiation de la transcription (phase précoce indépendante de Tat)*

Comme décrit précédemment, le LTR 5' du VIH-1 contient de multiples sites de liaison à des facteurs de transcription cellulaires, qui peuvent être activés par des stimuli externes, afin d'exercer leur activité par recrutement de cofacteurs positifs ou négatifs sur le LTR.

Parmi les facteurs répresseurs, nous retrouvons : YY1, LSF (Romerio et al., 1997), c-Myc (Wright et al., 1994), p50 (Montano et al., 1996), CBF1 (Tyagi and Karn, 2007).

D'autres facteurs sont activateurs et fondamentaux à la transcription virale : NF-κB (Clark et al., 1990), NFAT (Cron et al., 2000), Sp1 (Proudfoot et al., 1992), AP1 (Canonne-Hergaux et al., 1995; Colin et al., 2011), Ets (Seth et al., 1993), LEF1 (Sheridan et al., 1995) et STAT5 (Selliah et al., 2006). La transcription commence par l'assemblage du complexe de pré-initiation comprenant la RNA polymérase II (RNA Pol II) et le facteur de transcription IIIH (TFIIH), (figure 11).

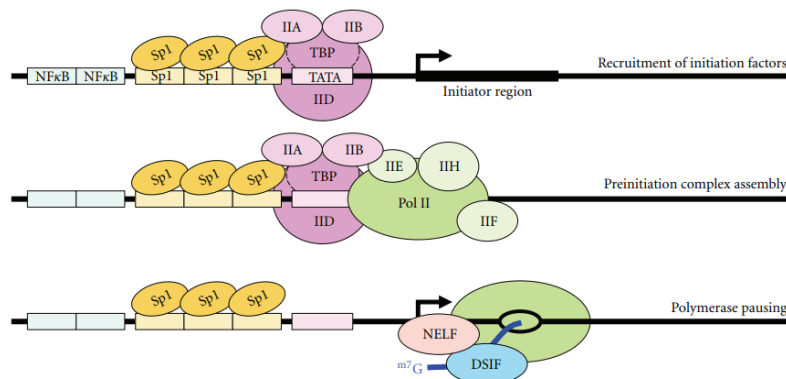


Figure 11 : Initiation de la transcription du VIH-1. L'initiation de la transcription commence par le recrutement des facteurs cellulaires tels que NF-κB, Sp1 et les facteurs généraux de la transcription (GTF), incluant les facteurs TFIIA, TFIIB, TFIID TFIIE, TFIIF et TFIIH. La RNA Pol II est recrutée au LTR par interactions avec le TFIID et d'autres composants du complexe de transcription basale. Le domaine CTD de la RNA Pol II est phosphorylé par la kinase CDK-7 du TFIIH, ce qui conduit à la clairance du promoteur. La Pol II est arrêtée par les facteurs négatifs DSIF et NELF, après la génération d'un court transcrit (Nilson and Price, 2011).

Dans le cas de la sous-unité p65 du facteur NF-κB il y aura recrutement des histones acétyltransférases (HAT), comme p300/CBP (CREB Binding Protein), qui va induire un remodelage de la structure chromatinienne et stimuler l'élongation (Zhong et al., 2002). La kinase Cdk7 de TFIIH va stimuler la phosphorylation de la serine-5 du domaine C-terminal de la RNA Pol II (CTD), ce qui va faciliter la clairance du promoteur et la transcription du TAR RNA (Kim et al., 2006; Parada and Roeder, 1996). A ce stade précoce, il se produit une pause de la transcription avec production de transcrits courts abortifs, qui sont dus à la liaison de

facteurs négatifs d'élongation de la transcription NELF (Negative Elongation Factor) et DSIF (DRB (5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole) Sensitivity Inducing Factor) à la RNA Pol II (Ping and Rana, 2001), (figure 11). Ainsi, la RNA Pol II s'accumule à des positions spécifiques du provirus qui chevauchent avec les nucléosomes (Jadlowsky et al., 2014) et montre le rôle critique du positionnement des nucléosomes dans la régulation de l'initiation de la transcription. Néanmoins, la production spontanée à bas niveau de transcrits viraux, pendant cette phase précoce, permet l'expression du transactivateur viral Tat. Quelques copies de Tat sont nécessaires pour entrer dans la prochaine étape de la transcription.

b- Elongation de la transcription (phase tardive Tat dépendante)

Le transactivateur Tat joue un rôle majeur dans la phase d'élongation de la transcription. Pour faire face au blocage transcriptionnel causé par NELF et DSIF, Tat se lie à TAR, une structure nucléotidique en tige boucle, située à l'extrémité 5' de tous les transcrits du VIH-1. Après la liaison à TAR, Tat induit le recrutement du SEC (Super Elongation Complexe) ainsi qu'un certain nombre de cofacteurs activateurs et crée une boucle de rétrocontrôle positif de la transcription, ce qui conduit à une infection productive (Ne et al., 2018).

SEC est un activateur puissant de l'élongation de la transcription comprenant plusieurs protéines cellulaires AFF1 et AFF2, AFF4, ENL, AF9, les facteurs d'élongation ELL1 et ELL2 et le complexe positif d'élongation de la transcription P-TEFb.

4.2.1.3- P-TEFb, un facteur clé de la transcription Tat dépendante du VIH-1

P-TEFb est composé de 2 sous-unités : la cycline-dépendante kinase 9 (CDK9) et son partenaire régulateur la cycline T (CycT). L'isoforme de 42 kDa de CDK9 est la forme prédominante de CDK9 dans de nombreux types cellulaires. Cependant, un isoforme à 55 kDa a été, également, rapporté (Shore et al., 2003). En plus de la cycline T1, une minorité de la CDK9 cellulaire peut lier la cycline T2a et T2b, mais, seule la cycline T1 interagit avec Tat (Ivanov et al., 1999; Peng et al., 1998).

P-TEFb induit la phosphorylation de la Sérine 2 au sein des répétitions d'heptapeptide (YSPTSPS) du domaine C-terminal (CTD) de la RNA Pol II (Zhou et al., 2012). En plus du CTD de la RNA Pol II, DSIF et NELF sont aussi phosphorylés par P-TEFb. La phosphorylation antagonise leurs actions inhibitrices, conduisant à la libération de la RNA Pol II en pause du promoteur proximal, et la transition vers une élongation productive (Fujinaga et al., 2004; Ivanov et al., 2000).

a- Séquestration de P-TEFb au sein du complexe 7SK snRNP

P-TEFb joue un rôle important dans la régulation de la transcription cellulaire et virale, dont l'activité doit être étroitement contrôlée en réponse aux changements des besoins de la cellule.

Il a été rapporté qu'environ la moitié des P-TEFb présents dans le noyau des cellules HeLa sont séquestrés dans un complexe inactif qui contient le petit RNA nucléaire 7SK (Nguyen et al., 2001). Produit par la RNA Pol III, le 7SK est un RNA non codant de 331 nucléotides, il est abondant et hautement conservé chez les eucaryotes (Wassarman and Steitz, 1991). La stabilité de cet RNA 7SK est assurée par deux composants MePCE (Methylphosphate Capping Enzyme) et LARP7 (Lupus antigen (La)-Related Protein 7), qui lient, respectivement, ses extrémités terminales en 5' et 3', formant ainsi le 7SK snRNP (7SK small nuclear Ribonucleoprotein) (Jeronimo et al., 2007). MePCE protège le 7SK RNA de l'action des exonucléases à son extrémité 5'. LARP7 lie la séquence poly U à l'extrémité 3', elle est, également, requise à la fixation de P-TEFb (Jeronimo et al., 2007; Markert et al., 2008), (figure 12).

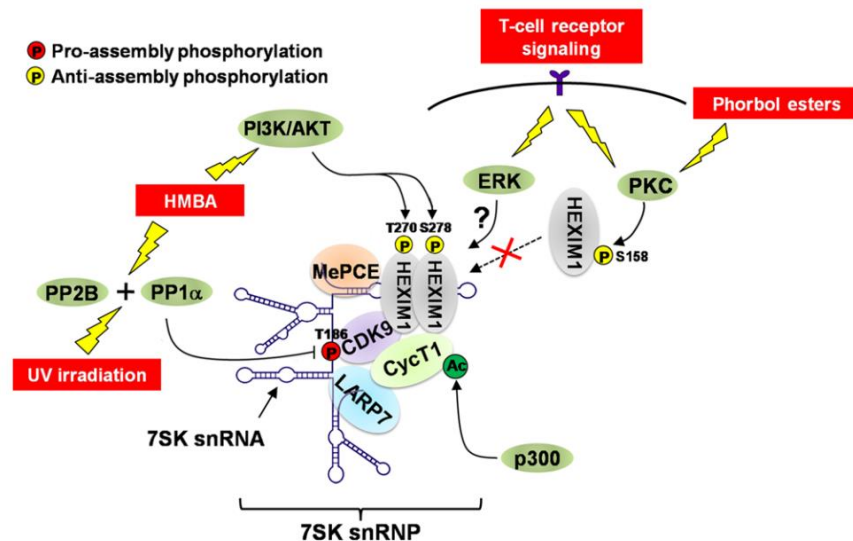


Figure 12 : Séquestration de P-TEFb dans le 7SK snRNP et sa libération, en réponse à l'activation de diverses voies de signalisations. En conditions basales, la majorité des P-TEFb sont séquestrés dans le 7SK snRNP, où l'activité kinase de P-TEFb est inhibée par HEXIM1. La stabilité du 7SK RNA est maintenue par MePCE et LARP7, qui se lient, respectivement, à ses extrémités 5' et 3'. Lorsque les cellules sont soumises aux traitements indiqués en rouge, diverses voies de signalisation sont activées pour entraîner des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation et l'acétylation des sous-unités de 7SK snRNP et la libération de P-TEFb (Lu et al., 2013).

P-TEFb lié à 7SK perd sa capacité à phosphoryler le CTD de Pol II, pour activer la transcription (Nguyen et al., 2001). Cependant, l'interaction 7SK-P-TEFb, seule, n'est pas suffisante pour inactiver P-TEFb. Une protéine nucléaire, appelée hexaméthylène bis-acétamide inducible 1 (HEXIM1), a été identifiée en tant que facteur associé à P-TEFb et le 7SK RNA (Yik et al., 2003). HEXIM1 s'associe sous forme de dimère à une structure en tige/boucle, située à l'extrémité 5' du 7SK RNA, leur permettant chacune d'interagir avec la cycline T1 et d'inhiber l'activité de P-TEFb sur la Pol II (Egloff et al., 2006; Michels et al., 2004). Il a été démontré que des mutants phosphomimétiques d'HEXIM1 sur les résidus tyrosines : Tyr271 et Tyr274

(Y271E/Y274E) bloquent l'assemblage de P-TEFb et HEXIM1 dans le complexe 7SK RNA, avec, pour conséquence, une libération de P-TEFb. A l'inverse, des mutants non phosphorylable d'HEXIM1 (Y271F/Y274F) induisent une séquestration continue de P-TEFb au sein du complexe 7SK RNA (Mbonye et al., 2015). Enfin, il est démontré que CTIP2 inhibe la transcription du VIH-1, en s'associant au complexe P-TEFb inactif par liaison à la boucle 2 du 7SK RNA, et par inhibition de l'activité de phosphorylation de la CDK9 sur la Ser2 de la RNA PolII. Ces effets seront détaillés dans la partie du répresseur transcriptionnel CTIP2 (Cherrier et al., 2013).

b- Déstabilisation du complexe 7SK snRNP et libération de P-TEFb

La CDK9 est capable de s'autophosphoryler, afin de réguler son activité, et son résidu Thr 186 y joue un rôle critique. La Thr 186 est, typiquement, associée à une CDK9 activée avec un site catalytique accessible. Bien que la CDK9 perde son activité kinase lorsqu'elle est séquestrée dans le 7SK snRNP, elle conserve la phosphorylation de son résidu Thr 186, qui est nécessaire à son incorporation dans ce complexe inactif (Li et al., 2005b). P-TEFb est séquestré de façon temporaire et réversible au sein de ce complexe inactif. L'exposition des cellules à divers agents inducteurs de stress, tels que le flavopiridol, la DRB et l'actinomycine D conduit à la dissociation rapide du 7SK snRNP et à une augmentation du pool de P-TEFb libre. Cependant, ces molécules inhibent l'activité kinase de la CDK9 et la transcription du VIH-1 (Biglione et al., 2007). L'activation de la voie TCR (T Cell Receptor) par des anticorps anti-CD3/anti-CD28 dans les lignées cellulaires T Jurkat joue, également, un rôle dans la déstabilisation du 7SK snRNP, en induisant la phosphorylation de la Ser158 d'HEXIM1, qui perd sa capacité à lier le 7SK snRNP et à inhiber P-TEFb. Il s'ensuit une libération du P-TEFb, avec augmentation de la transcription du VIH-1 (Fujinaga et al., 2012; Natarajan et al., 2010).

Les phosphatases telles que PP1 α et PP2 β sont activées par l'HMBA ou l'irradiation UV et agissent en coopération pour déphosphoryler la Thr186 et libérer P-TEFb, qui est, ensuite, activée par phosphorylation par un mécanisme encore inconnu (Chen et al., 2008). Dans les lignées de cellules T Jurkat, l'HMBA peut, également, conduire à la phosphorylation d'HEXIM1 sur les résidus Thr270 et Ser278 de liaison à la CycT1 et à une dissociation du 7SK snRNP (Contreras et al., 2007). Ces voies de libération de P-TEFb contribuent à stimuler la transcription du VIH-1, (figure 12). L'acétylation de la CycT1 par l'acétyltransférase p300 a été décrite pour libérer P-TEFb du 7SK snRNP. En revanche, ces résultats montrent que cette acétylation réversible de la cycline T1 sert à maintenir l'équilibre physiologique entre P-TEFb actif et inactif dans les cellules, mais n'est pas requise pour l'action de Tat (Cho et al., 2009).

En plus de tous ces facteurs de libération de P-TEFb, la protéine virale Tat joue un rôle important dans le recrutement de P-TEFb actif sur le promoteur viral, afin de favoriser l'étape d'élongation de la transcription virale (Muniz et al., 2010).

c- Recrutement de P-TEFb par Brd4

Comme mentionné, il n'y a, pratiquement, aucun hétérodimère de P-TEFb libre dans la cellule. Une fois libéré du 7SK snRNP, la plupart des P-TEFb se lie à Brd4 (Bromodomain-containing protein 4), (figure 13). Brd4 est un membre de la famille des protéines BET (Bromodomain and extraterminal domain) exprimé de façon ubiquitaire. Il comporte deux Bromodomains en N-terminal et un domaine extraterminal (en C-terminal) d'interaction protéique. Le domaine C-terminal interagit avec P-TEFb, les deux Bromodomains lient les histones acétylées (Bisgrove et al., 2007; Dey et al., 2003). En condition de stress (UV, HMBA), les HDAC1/2/3 (par déacétylation des lysine 5 et 8 de l'histone H4 H4K5ac/K8ac) coopèrent avec la PP1 α (déphosphoryle la sérine 10 de l'histone H3 H3S10) pour libérer Brd4, qui est séquestré dans la chromatine des cellules au repos (Hu et al., 2014). Brd4 va, ainsi, recruter P-TEFb pendant la mitose et conduire à l'expression des gènes dépendants de P-TEFb, dès le début de la phase G1 du cycle cellulaire. A ce titre, Brd4 joue un rôle clé dans la transmission de la mémoire épigénétique au cours de la division cellulaire (Dey et al., 2003; Yang et al., 2008). En somme, P-TEFb est maintenu en équilibre fonctionnel par des interactions réversibles avec les régulateurs positif (Brd4) et négatif (HEXIM1-7SK-LARP7-MePCE).

En cas d'infection par le VIH-1, Brd4 est en compétition avec Tat, pour la fixation de P-TEFb. Brd4 interfère avec le recrutement efficace de p-TEFb par Tat sur la région TAR des RNA viraux initiés (Yang et al., 2005).

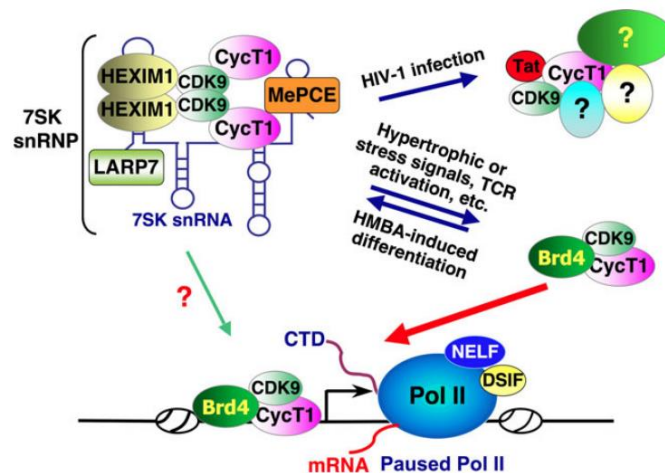


Figure 13 : Recrutement de P-TEFb par Brd4. Dans certaines conditions de stimulations ou en présence de Tat, P-TEFb est libéré du complexes 7SK snRNP pour stimuler l'élongation de la transcription des gènes cellulaires ou viraux (He and Zhou, 2011).

d- Recrutement de P-TEFb par Tat et formation du SEC

- Recrutement de P-TEFb par Tat

Plusieurs études ont montré que Tat recrute P-TEFb au promoteur, suite à son relargage du complexe 7SK snRNP, (figure 14). Des analyses structurales et fonctionnelles approfondies ont révélé une grande similarité entre le complexe Tat-TAR-P-TEFb et le 7SK snRNP. Différentes études ont proposé plusieurs mécanismes d'extraction de P-TEFb par Tat.

Premièrement, le domaine de Tat, riche en arginine qui lie TAR, est, fortement, homologue et fonctionnellement interchangeable avec une partie du motif de liaison d'HEXIM1 au 7SK (Muniz et al., 2010; Yik et al., 2004).

Secondairement, le site de fixation de Tat au TAR RNA est structurellement et fonctionnellement similaire à la région du 7SK RNA, qui lie HEXIM1 (Muniz et al., 2010). L'idée est que Tat puisse utiliser ce motif pour interagir avec la région du 7SK snRNP, à laquelle est, normalement, lié HEXIM1, et déplacer ce dernier pour former un complexe 7SKsnRNP dépourvu d'HEXIM1 (Muniz et al., 2010). Après la synthèse du TAR RNA, Tat et P-TEFb peuvent être transférés hors de ce complexe, pour former le complexe contenant Tat-TAR-P-TEFb sur le promoteur viral. Un complexe, nommé Tatcom2, contenant Tat, P-TEFb et toutes les autres sous-unités du 7SK snRNP, mais dépourvu d'HEXIM1, a été identifié (Sobhian et al., 2010). Ce complexe a été décrit dans les cellules dépourvues de TAR RNA, et semble être un complexe de transition entre le 7SK snRNP et le complexe Tat-TAR-P-TEFb.

Une 3^{ème} hypothèse montre qu'une petite région, proche du domaine cycline N-terminal de CycT1, peut être liée soit par HEXIM1 ou par Tat (Michels et al., 2003). La mutation d'un résidu Y175 au centre de ce domaine abolit la liaison de la CycT1 à Tat et HEXIM1 (Verstraete et al., 2014). Plusieurs études montrent que Tat se lie à CycT1, avec une affinité plus élevée qu'HEXIM1. Il a été proposé que Tat utiliserait ce domaine pour entrer en compétition avec HEXIM1 et le déplacer de son interaction avec CycT1 (Schulte et al., 2005a). Après que P-TEFb ait été capturé par Tat, un changement conformationnel du 7SK snRNP conduit à l'éjection d'HEXIM1 (Krueger et al., 2010). Ces observations contribuent à démontrer que Tat tire profit de ces homologies pour extraire P-TEFb directement du 7SK snRNP.

Des travaux approfondis ont mis en évidence la localisation du site d'extraction de P-TEFb par Tat. Bien que la grande majorité du 7SK snRNP soit retrouvée hors de la chromatine, une petite partie a été détectée au niveau du promoteur du VIH (D'Orso and Frankel, 2010a; Li et al., 2005b). Une étude suggère qu'HEXIM1 se lie à TAR et inhibe l'activité kinase de P-TEFb, ce qui implique une association du 7SK snRNP avec le LTR par l'intermédiaire de TAR. HEXIM1 pourrait ainsi inhiber la phase d'élongation de la transcription du VIH, en l'absence de Tat

(Sedore et al., 2007). A présent, il est clairement établi que le 7SK snRNP se lie au LTR durant la phase précoce de transcription des gènes du VIH-1 (McNamara et al., 2016). Néanmoins, ces niveaux restent très faibles et non comparables à ceux observés pour P-TEF, détecté sur le LTR après activation par Tat (D'Orso and Frankel, 2010a). Globalement, ces observations portent à croire que le complexe d'élongation Tat-P-TEFb s'assemble au promoteur viral, suite à l'interaction Tat-TAR, et conduit à la libération concomitante de P-TEFb du 7SK snRNP (D'Orso and Frankel, 2010a).

Enfin, le processus par lequel Tat extrait P-TEFb du 7SK snRNP pourrait, également, nécessiter la contribution d'autres cofacteurs cellulaires. Par exemple, l'interaction de Tat avec la protéine phosphatase PP1 contribue à la déstabilisation du 7SK snRNP, par déphosphorylation de la Thr186 de la CDK9. Il a été démontré que PP1 joue un rôle positif dans la transactivation et la réplication du VIH par Tat (Ammosova et al., 2005, 2011). Par contre, la libération de CDK9 déphosphorylée, est catalytiquement inactive, et implique une étape de re-phosphorylation ultérieure, qui reste à définir (Chen et al., 2008).

Deux facteurs nommés AFF1 et 4 (AF4/FMR2 family member 1/4), initialement décrits comme constituants du SEC, ont été retrouvés liés à la CycT1 et présents dans tous les complexes majeurs P-TEFb (7SK snRNP et Brd4). AFF1 et son homologue AFF4 augmenteraient l'affinité de Tat pour P-TEFb, ce qui facilite son extraction du complexe 7SK snRNP et mène à la formation du SEC. En l'absence d'AFF1/4 du 7SK snRNP, Tat est beaucoup moins efficace pour extraire P-TEFb (Lu et al., 2014; Schulze-Gahmen et al., 2013).

- Tat assemble le SEC pour activer la transcription virale

Comme expliqué précédemment, Tat induit la libération de P-TEFb à partir de 7SK snRNP, il s'ensuit le recrutement du SEC à la TAR et aux transcrits de RNA naissants. Le SEC est un activateur puissant de la phase d'élongation de la transcription et comprend plusieurs facteurs cellulaires : AFF1 et 4, les facteurs d'élongation ELL1 et 2, ENL et AF9 (He et al., 2010; Sobhian et al., 2010), (figure 14). AFF1 et 4, présents dans des SEC séparés, servent de plateforme à la formation du complexe (He et al., 2010).

ELL1/2 sont des facteurs d'élongation qui utilisent un mécanisme différent de celui de P-TEFb. Ils stimulent l'élongation en augmentant l'activité catalytique et la processivité de la RNA Pol II (Shilatifard et al., 1996).

Les sous-unités ENL et AF9 contribuent de façon importante à l'activité du SEC. ENL-AF9 utilisent leur domaine YEATS N-terminal pour recruter le complexe PAF (Polymerase-Associated Factor complex), afin d'orienter le SEC sur la RNA Pol II et permettre une élongation productive (He et al., 2011).

Ainsi, Tat intervient dans le recrutement de toutes ces protéines du SEC, en interaction avec P-TEFb sur la TAR et les transcrits de RNA naissants, pour permettre une élongation productive. Il est à préciser qu'en plus du recrutement du SEC, Tat entraîne la liaison de co-activateurs supplémentaires de la transcription tels que des complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants. Tat recrute aussi des acétyltransférases comme p300, CBP, GCN5 et PCAF sur LTR du VIH-1 contribuant à l'établissement d'un environnement favorable pour la transcription par hyperacétylation des histones (Benkirane et al., 1998; Col et al., 2001; Lusic et al., 2003).

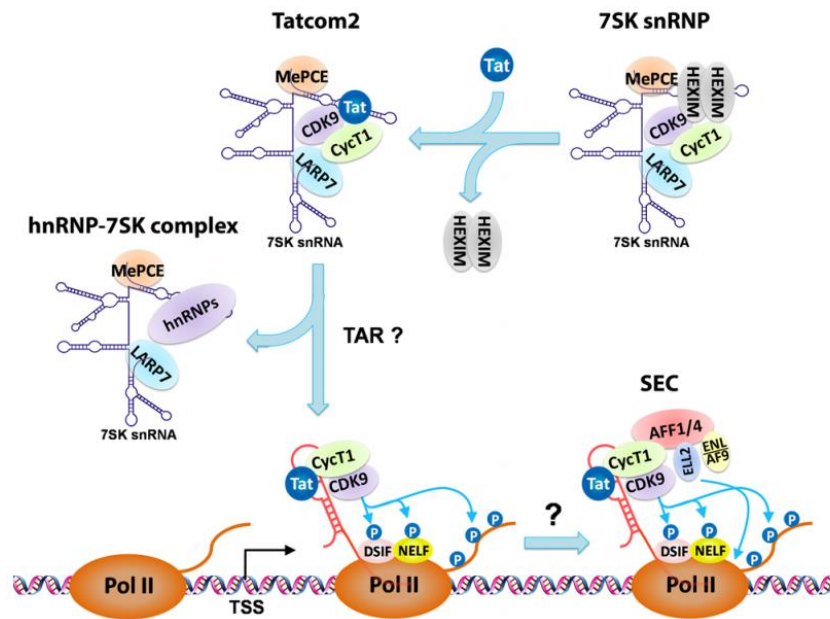


Figure 14 : Recrutement de P-TEFb par Tat et formation du SEC. Tat cible le 7SK snRNP pour capturer P-TEFb et libérer HEXIM1. Le complexe Tatcom2, dont la composition est semblable à celle du 7SK snRNP, à l'exception de la substitution d'HEXIM1 par Tat, semble être un intermédiaire réactionnel avant la production du TAR RNA. P-TEFb et Tat sont transférés sur la TAR une fois produite, et conduisent à la formation du SEC. P-TEFb, phosphoryle le CTD de la Pol II et des facteurs négatifs d'élongation NELF et DSIF. ELL2 augmente l'activité catalytique de Pol II. En agissant sur la même enzyme Pol II, P-TEFb et ELL2 activent de façon synergique la transcription du VIH-1 (Lu et al., 2013).

4.2.2- Epissage, export et traduction des RNA du VIH-1

a- Epissage alternatif des mRNA du VIH-1

Pour produire tous les mRNA qui codent pour les protéines virales, les transcrits primaires du VIH-1 subissent un épissage alternatif complexe dans le noyau des cellules infectées. La plupart des souches de VIH-1 utilisent quatre différents sites donneurs d'épissage en 5' et huit sites accepteurs d'épissage en 3', pour produire plus de 40 mRNA épissés différemment dans les cellules infectées, (figure 15).

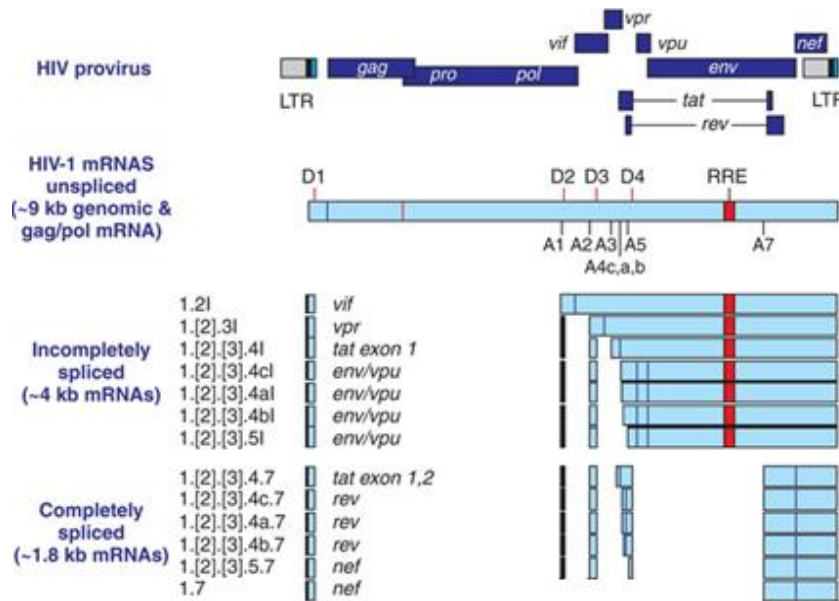


Figure 15 : Emplacements des sites d'épissage des exons et des éléments épissés dans le génome du VIH-1. Diagramme du haut : représentation schématique du génome du VIH-1. Les rectangles bleu foncé indiquent les cadres ouverts de lecture avec les noms de gènes. Au milieu, les sites donneurs d'épissage sont désignés de D1 à D4 et les sites accepteurs d'A1 à A7. L'emplacement du RRE est indiqué par le rectangle rouge. Les exons présents dans les mRNA partiellement (4 kb) et entièrement épissés (1,8 kb) sont représentés en rectangles bleu clair. Les emplacements des codons AUG utilisés pour initier la synthèse protéique sont présentés par des barres violettes dans les exons ((Karn and Stoltzfus, 2012) avec modifications).

Ceux-ci comprennent plusieurs mRNA non épissés (9 kb), qui codent pour les protéines structurales précurseurs Gag et Gag-Pol, les mRNA partiellement épissés (4 kb), qui codent pour Env et les protéines accessoires Vif, Vpr et Vpu, et les mRNA complètement épissés, qui codent pour les protéines régulatrices Tat, Rev et Nef (Stoltzfus, 2009).

Les transcrits partiellement et non épissés sont dégradés dans le noyau. Pour contourner ces mécanismes de surveillance, le VIH-1 exprime des facteurs régulateurs qui facilitent le transport hors du noyau du RNA viral contenant des introns. Parmi ces facteurs, la protéine Rev qui interagit avec une structure de RNA en tige boucle, désignée sous le nom Rev-responsive element (RRE) (Malim et al., 1989). Ainsi, les mRNA de 9 et 4 kb du VIH-1 nécessitent Rev pour leur transport cytoplasmique et leur expression. En revanche, les mRNA de 1,8 kb, totalement épissés et dépourvus de RRE, sont exportés vers le cytoplasme par une voie utilisée par les mRNA cellulaires. Il est démontré que la méthylation de l'adénosine A7883 dans le RRE constitue un niveau supplémentaire de régulation du transport des mRNA. Cette modification favorise la liaison de REV au RRE augmentant ainsi l'efficacité d'export des mRNA viraux vers le cytoplasme (Lichinchi et al., 2016).

Rev lie la séquence RRE et transporte le RNA à travers le NPC, (figure 16). Par son signal d'export nucléaire (NES : Nuclear Export Signal), près de son extrémité carboxy-terminale,

REV interagit avec la karyopherine Crm1 (Chromosome maintenance region 1, également appelé exportin 1) (Pollard and Malim, 1998). Le principe de l'export nucléaire est semblable à celui de l'import, Crm1 lie des protéines cargo à domaine NES en présence de la RanGTPase. Après passage au travers du NPC, dans le cytoplasme, le GTP est hydrolysé en GDP par les protéines RanGAP (Ran GTPase-Activating Protein) et RanBP1. Cela déstabilise le complexe Rev et le libère du RRE. Rev réintègre le noyau en se liant au facteur d'import nucléaire, l'importin- β (Henderson and Percipalle, 1997).

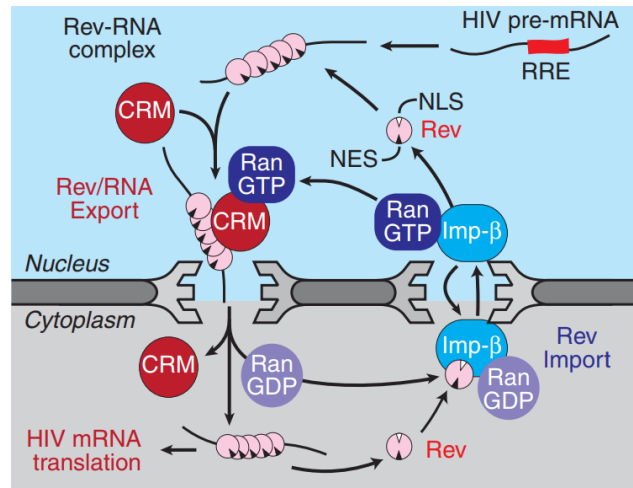


Figure 16 : Cycle d'export des RNA viraux par Rev. Rev et le complexe d'export nucléaire contenant CRM-1 sont exportés vers le cytoplasme, suite à l'interaction avec les protéines des pores nucléaires. Dans le cytoplasme, RanGTP est converti en RanGDP par RanGAP et RanBP1. CRM-1 est, alors, transporté de nouveau dans le noyau, et Rev est libéré du RRE. L'importin- β se lie à Rev à travers son NLS et interagit avec Ran-GDP, pour faciliter son import nucléaire. Dans le noyau, RanGDP est converti en RanGTP, ce qui libère Rev, qui peut commencer un autre cycle d'export (Karn and Stoltzfus, 2012).

b- Traduction des mRNA

Tous les transcrits du VIH-1 épissés et non épissés possèdent le même 5' UTR (5' untranslated region). Comme cette région présente plusieurs motifs, hautement structurés, tels que la TAR, le domaine PBS, le signal de polyadénylation et le site de dimérisation, le processus de balayage par les ribosomes est inefficace. Il a été démontré que la RNA hélicase DDX3 est nécessaire pour surmonter cette contrainte. DDX3 se lie, directement, au 5' UTR du VIH-1 et interagit avec le facteur cellulaire d'initiation eIF4G (eukaryotic Initiation Factor 4G) et PABP (Poly(A)-Binding Protein). Ces interactions favorisent l'initiation de la traduction du RNA génomique du VIH-1 et servent de médiateur à l'assemblage du complexe de pré-initiation d'une manière ATP dépendante (Soto-Rifo et al., 2012).

Les mRNA non épissés peuvent initier la traduction des polyprotéines Gag et Gag-Pol, soit par un mécanisme classique de reconnaissance de coiffe, ou par des sites internes d'entrée du ribosome (IRES). L'initiation de la traduction dépendante de la coiffe nécessite la

reconnaissance en 5' UTR de cette coiffe par le complexe eIF4F, pour favoriser le recrutement du complexe de pré-initiation 43S. Le mRNA du VIH-1 présente deux IRES : l'un dans le 5' UTR et le second dans la région codante de Gag. La coiffe et l'IRES du VIH-1 permettent la traduction de la polyprotéine Pr55 Gag et la polyprotéine précurseur Pr160 Gag-Pol (Monette et al., 2013). La polyprotéine Gag-Pol est traduite suite à un décalage du cadre de lecture ribosomique équivalent à un nucléotide. Ce changement de cadre se produit 5% du temps, et se traduit par la production d'environ un précurseur Gag-Pol pour chaque 20 Gag synthétisé.

Ce processus est régulé par deux principaux facteurs : une séquence heptanucléotidique, située à 200 nucléotides en amont du codon de terminaison Gag (UUUUUUA), dans laquelle se déroule le décalage et une séquence de RNA en aval, appelée FSS (Frameshift Stimulatory Signal), qui contrôle l'efficacité du décalage. Ce décalage place le codon de terminaison Gag dans un contexte hors cadre, permettant à la traduction de continuer vers la séquence Pol en aval (Hill et al., 2005b).

4.2.3- Les protéines du VIH-1

a- Les protéines dérivées des transcrits Gag

Les transcrits de Gag conduisent à la formation de la polyprotéine Pr55 Gag, qui est composée de quatre domaines codant pour les protéines structurales MA, CA, NC, p6 et deux peptides p1 et p2. L'ordre du N au C-terminal des six protéines et peptides est MA-CA-p2-NC-p1-p6, et contiennent cinq sites de clivage protéolytique.

b- Les protéines dérivées des transcrits gag-pol

Ce transcrit est produit à la suite d'un décalage du cadre de lecture dans le gène *gag*, et conduit à la formation de la polyprotéine Pr160 Gag-Pol. Cette polyprotéine est clivée pour produire MA, CA, p2, NC, TF (Transframe Protein), et les enzymes virales PR, RT et IN.

c- Les protéines dérivées des transcrits env

Les transcrits *env* conduisent à la formation du précurseur Pr160 Env glycosylé qui après clivage, donnent naissance aux protéines gp120 et gp41 présentes à la surface des virions.

d- Les protéines régulatrices Tat et Rev

Comme mentionnée précédemment, Tat est le transactivateur de la transcription qui se lie à la TAR dans le segment répété du LTR (+1 à +59) (Feng and Holland, 1988). Tat aide à recruter P-TEFb et à assembler le SEC pour favoriser la phosphorylation de la RNA Pol II et augmenter sa processivité. Les données concernant cette protéine seront détaillées dans le chapitre suivant. Comme indiqué auparavant, Rev intervient dans le transport des mRNA viraux, non épissés et partiellement épissés, du noyau vers le cytoplasme.

e- Les protéines Accessoires Nef, Vif, Vpr, Vpu

- Nef

Nef est une protéine de 27 kDa, produite en abondance durant les premières étapes du cycle de réplication virale. C'est une protéine hautement conservée au sein des lentivirus de primates, et joue un rôle important à différentes étapes du cycle de réplication. La protéine Nef est produite au début de l'infection, et est présente sous plusieurs formes biologiques : associée au virion, soluble libre dans le plasma et dans des vésicules extracellulaires plasmiques. Nef interagit avec TNF, afin de mimer son action par activation des voies telles que : NF- κ B, AP1, JNK et AKT (Herbein and Khan, 2008; Kumar et al., 2016). Par conséquent, les deux protéines TNF et Nef favorisent l'activation immunitaire, améliorent la transcription, la réplication du VIH-1 et la progression de la maladie (Herbein, 2016).

Il est aussi rapporté que Nef entrave la réponse immunitaire des patients infectés par régulation négative de l'expression de MHC (Major Histocompatibility Complex) I, MHC II, CD28 et CD4. La régulation négative de l'expression de CD4 dans les macrophages sert à favoriser la libération virale, en évitant leur séquestration mais aussi à éviter la surinfection qui pourrait entraîner une mort cellulaire prématurée (Kumar and Herbein, 2014). De plus, Nef augmente la production d'IL2 par les lymphocytes T, de même que l'induction de sécrétions de chemokines par les macrophages pour attirer les lymphocytes T quiescents et favoriser leur infection. Nef peut induire le remodelage de l'actine et faciliter le déplacement du virus durant la phase initiale d'infection. Enfin, Nef a la capacité de lier le cholestérol néosynthétisé et de le transporter aux sites de bourgeonnement du virus (Li et al., 2005a).

- Vif

Vif (Viral infectivity factor) est une protéine de 192 acides aminés, décrite pour être essentielle à la réplication virale. Vif cible l'APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G), une cytidine désaminase cellulaire qui, en l'absence de Vif, est emballée dans les virions. APOBEC3G provoque de graves mutations au génome viral pendant l'étape de transcription inverse. Elle empêche la synthèse du cDNA viral par désamination des désoxycytidines (dC) dans le brin négatif du cDNA rétroviral, et produit une désoxyuridine (mutation de cytosine en uracil), qui est interprétée par la transcriptase inverse en tant que mutation de la guanosine en adénosine, lors de la synthèse du brin positif de cDNA. Cette hypermutation du provirus conduit à son inactivation ou à l'activation des mécanismes de réparation du DNA cellulaire, qui va entraîner une fragmentation du cDNA viral. Ainsi, APOBEC3G représente un mécanisme inné de défense de l'hôte contre l'infection par le VIH-1. Le virus a développé une stratégie pour contrecarrer l'effet antiviral d'APOBEC3G par Vif.

Généralités : le Virus de l'Immunodéficience Humaine VIH-1

Cette protéine virale se lie, simultanément, à APOBEC3G et provoque sa polyubiquitination par le complexe Rbx2/Cullin5 E3 ubiquitine ligase, conduisant à sa dégradation.

Vif stabilise, également, le complexe nucléoprotéique viral par interaction directe avec la région 5' du RNA génomique du VIH-1. De plus, elle module la transcriptase inverse du virus via son domaine C-terminal, soit en stimulant la liaison de la RT et de l'amorce, soit en augmentant le taux de polymérisation de la RT (Li et al., 2005a).

- Vpr

Vpr (Viral protein r) est une protéine de 96 acides aminés impliquée dans la réponse aux dommages de DNA, l'import nucléaire du PIC, la régulation positive des ligands activateurs de NK, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M, la régulation de l'apoptose et la favorisation de l'infection des macrophages. Elle est incorporée dans les virions par interaction avec la région p6 carboxy-terminale du précurseur de Pr55 Gag.

Durant l'étape d'assemblage du virus, le tRNA^{3^{lys}} est incorporé grâce à son interaction avec Vpr, ce qui permet l'étape de transcription inverse (Stark and Hay, 1998).

Il a été démontré que Vpr interagit avec la forme nucléaire d'UNG2 (Uracil DNA Glycosylase), une enzyme de réparation de DNA en cas d'incorporation erronée de dUTP (deoxyuridine triphosphate) ou par déamination d'une cytosine. Elle facilite l'incorporation de cette protéine dans les virions, afin de diminuer le taux de mutations virales (Chen et al., 2004).

En tant que constituant du PIC, Vpr se concentre à l'enveloppe nucléaire, peu de temps après l'infection. Elle interagit avec les composants des complexes des pores nucléaires pour promouvoir l'import nucléaire du PIC (Le Rouzic et al., 2002; Popov et al., 1998). Par son rôle dans l'import nucléaire du PIC, Vpr augmente l'infection des macrophage (Connor et al., 1995). L'activation par Vpr de la voie ATR (Ataxia Telangectasia and Rad3-related) de réponse aux dommages de DNA, conduit à une augmentation des ligands des récepteurs aux cellules NK, NKG2D à la surface des cellules T infectées. Ceci a pour résultat une susceptibilité accrue à l'activité cytolytique des cellules NK (Richard et al., 2010).

Vpr induit un arrêt en phase G2 du cycle cellulaire. La progression des cellules de la phase G2 du cycle cellulaire à la mitose est un processus qui nécessite l'activation de la kinase Cdc2, dont l'activité est régulée par son état de phosphorylation. Cdc2 est phosphorylée par la kinase Wee1, en fin de phase G2, et, rapidement, déphosphorylée par la tyrosine phosphatase Cdc25 pour déclencher l'entrée en mitose. L'activation de la voie ATR par Vpr va induire l'activation de Chk1 (checkpoint 1) par phosphorylation. Chk1 va, alors, phosphoryler Cdc25 pour l'inactiver, entraînant ainsi l'arrêt en phase G2. Vpr régule positivement l'expression de p21, qui inactive la kinase Cdc2 (Andersen et al., 2008).

Vpr joue différents rôles dans l'apoptose, en fonction de son niveau d'expression. Au début du cycle viral, la faible expression de Vpr lui confère un rôle anti-apoptotique, car elle régule positivement l'expression de Bcl-2 et régule négativement l'expression de BAX ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires.

Vpr déclenche la perméabilisation de la membrane mitochondriale par son interaction avec la protéine ANT (Adenine Nucleotide Transporter) transmembranaire. La perméabilisation des membranes mitochondriale entraîne la libération de protéines pro-apoptotiques, comme le cytochrome c (Jacotot et al., 2001).

Vpr se lie au promoteur LTR à travers les sites Sp1, pour activer la transcription. Elle interagit avec Sp1, TFIIB, NF- κ B, p300 et Tat, pour renforcer la transcription du génome du VIH-1 (Kilareski et al., 2009).

Afin d'exercer ses fonctions, Vpr peut détourner la machinerie d'ubiquitination par interaction avec les complexes E3 ubiquitine ligase CUL4A-DDB1-DCAF1 (Cullin4A-damaged DNA Binding protein 1-DDB1-Cullin4-Associated-Factor), qui conduit à une dégradation par la voie du protéasome. L'enzyme de réparation de DNA, UNG2 est la seule protéine décrite pour être ciblée et dégradée par Vpr (Schröfelbauer et al., 2005).

- Vpu

Vpu (Viral protein u) est une petite protéine membranaire de 9 kDa, qui optimise la libération des virions des cellules infectées et induit la dégradation du récepteur CD4 (Margottin et al., 1998). Vpu recrute un complexe cullin1-Skp1 ubiquitine ligase à l'extrémité cytoplasmique de CD4, pour induire sa dégradation. De plus, cette protéine virale favorise la libération du virus en neutralisant les activités antivirales d'un facteur inductible à l'interféron α , nommé BST-2 (Bone marrow Stromal antigen 2) ou Tetherin (Neil et al., 2008). En l'absence de Vpu, CD4 et BST-2 inhibent la libération de particules virales infectieuses. CD4 se lie aux virions par des interactions avec les glycoprotéines Env et BST-2 empêche le bourgeonnement des virus, en les maintenant attachés à la membrane plasmique. Vpu contrecarre la restriction de BST-2 en l'internalisant et en le séquestrant dans des compartiments loin des sites de bourgeonnement du virus. Vpu peut, également, recruter le complexe E3 ubiquitine ligase cullin1-Skp1, pour dégrader BST-2 (Harris et al., 2012).

4.2.4- Assemblage de la particule virale

L'assemblage du virus se déroule à la membrane plasmique où les glycoprotéines Env s'accumulent. L'assemblage commence par la synthèse de la polyprotéine Pr55 Gag dans le cytosol et sa translocation vers la membrane plasmique. Lors de son trafic vers la membrane

plasmique, Gag interagit avec le dimère de RNA viral. Gag recrute, ensuite, le complexe cellulaire ESCRT (endosomal sorting complex required for transport), qui permet un remodelage membranaire afin d'entraîner la réaction de scission nécessaire à la libération des particules, (figure 17).

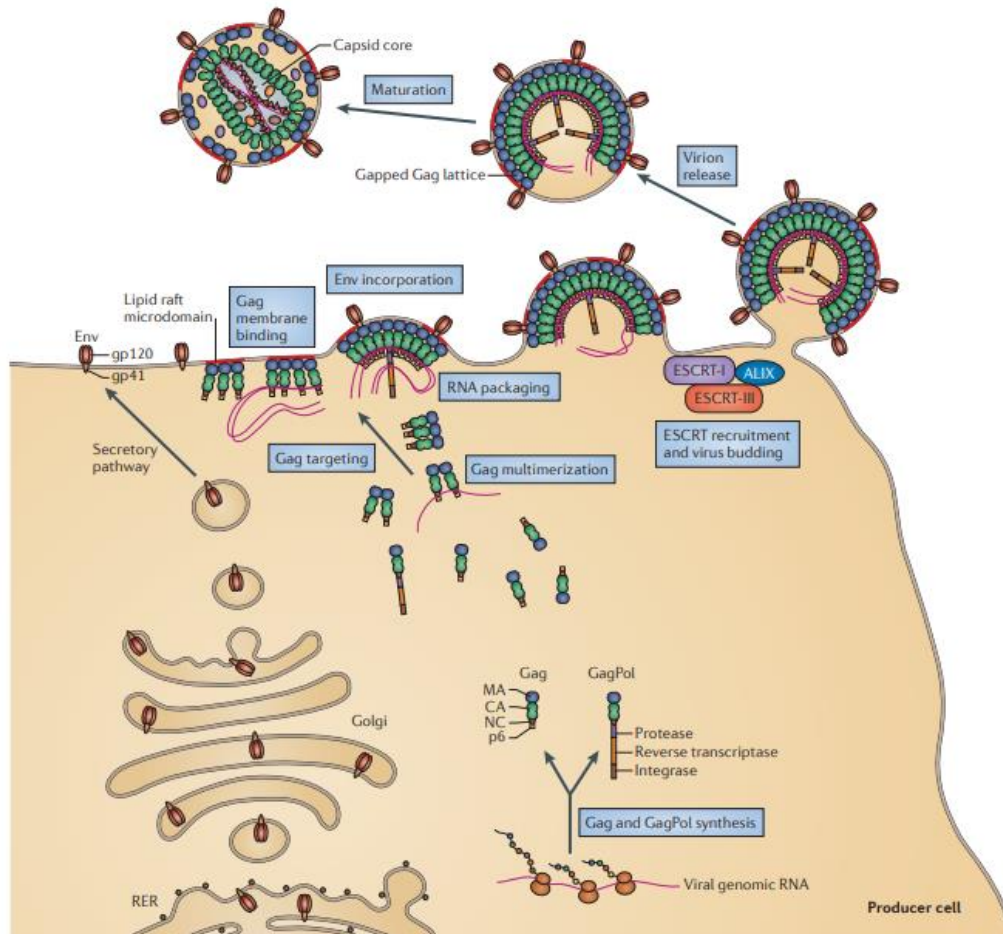


Figure 17 : Assemblage, bourgeonnement et maturation de la particule virale. Les glycoprotéines de l'enveloppe virale transitent par la voie sécrétoire, du réticulum endoplasmique rugueux au Golgi, puis dans les vésicules jusqu'à la membrane plasmique. Gag recrute le RNA génomique viral, se multimérise et atteint la membrane plasmique par une voie encore indéfinie. Gag myristoylée est ancrée à la membrane plasmique dans des microdomaines, appelés radeaux lipidiques. La particule en formation recrute le complexe ESCRT-I par interaction entre p6 et les sous-unités TSG101 et ALIX de l'ESCRT-I. Au fur et à mesure du bourgeonnement, les complexes ESCRT-III et VPS4 sont recrutés et entraînent la réaction de scission membranaire, qui conduit à la libération des particules. La maturation, qui conduit à la formation d'une capside conique, est déclenchée par clivage protéolytique des précurseurs de Gag et GagPol par la protéase virale (Freed, 2015a).

4.2.5- Bourgeonnement du virus

Le virus détourne la voie ESCRT cellulaire pour terminer la polymérisation de Gag et catalyser la libération du virus. Le domaine P6 de Gag se lie, directement, à la sous-unité TSG101 et au facteur ALIX du complexe ESCRT-I. Ces interactions aboutissent au recrutement des sous-unités CHMP1, CHMP2 et CHMP4 du complexe ESCRT-III qui se polymérisent en dôme pour

forcer la fermeture des membranes opposées et favoriser la fission (Sundquist and Kräusslich, 2012).

4.2.6- Maturation des particules virales

Exprimé seul, Gag est capable d'induire l'assemblage et la libération de particules virales immatures non infectieuses. L'infectivité des particules nécessite l'activité protéolytique de la protéase virale. De façon concomitante à la libération du virus, la protéase virale déclenche la maturation du virus, en clivant un certain nombre de sites dans les polyprotéines Gag et GagPol. Ce processus est accompagné d'un changement majeur dans la morphologie du virion. Dans la particule immature, les molécules de Gag sont disposées de manière radiale. Après la libération des domaines Gag par la protéase, les protéines de MA constituent une couche sous la membrane virale, et les CA se réassemblent pour former le noyau conique autour du génome viral (Freed, 2015b).

Le transactivateur de la transcription du VIH-1 : Tat

La protéine Tat du VIH-1 joue un rôle clé dans la pathogenèse du SIDA. Outre son rôle activateur de la transcription virale, Tat exerce plusieurs fonctions importantes sur les cellules infectées et non infectées. Libérée par les cellules infectées, Tat est capable d'entrer dans les cellules cibles et d'induire de multiples effets. De cette manière, elle régule l'expression des gènes viraux et module plusieurs gènes et voies cellulaires conduisant à la propagation de l'infection et à une dérégulation immunitaire.

1- Organisation structurale de Tat

Tat est une petite protéine nucléaire à deux exons de 14 à 16 kDa, dont la longueur varie entre 86 et 101 acides aminés en fonction des souches virales ou des variants adaptés au laboratoire. Malgré le taux élevé de mutation du virus, Tat est, relativement, bien conservée dans tous les lentivirus de primates. La protéine Tat est codée à la phase précoce de l'infection à partir des mRNA entièrement épissés.

La séquence primaire de Tat peut être divisée en six domaines, définis sur la base de la distribution des acides aminés, (figure 18). La région I (aa 1-21) N-terminale, acide riche en proline, impliquée dans le processus d'insertion membranaire (Yezid et al., 2009). La région II (aa 22-37), riche en cystéine (7 résidus cystéines), est impliquée dans la stabilisation de la structure protéique et sa dimérisation. Elle est responsable de la formation de ponts disulfures intramoléculaires, et caractérisée par la présence de deux doigts de zinc, nécessaires à l'interaction avec son cofacteur, la Cycline T1 (Tahirov et al., 2010). La région III (aa 38-48) centrale hydrophobe confère un rôle structural et fonctionnel à Tat, par liaison à la TAR du RNA naissant. Des études mutationnelles ont indiqué que la Glycine 44 et la Lysine 41 de Tat sont nécessaires pour la liaison de TAR (Churcher et al., 1993). La région IV (aa 49- 57) basique riche en arginine participe à la liaison à TAR et à l'import nucléaire de Tat, en agissant comme une séquence NLS. Des travaux ont montré que l'internalisation de Tat dans les cellules est, également, due à la liaison de cette région basique aux protéoglycanes et héparane sulfate cellulaire, qui agirait en tant que récepteurs cellulaires de Tat (Hauber et al., 1989; Siomi et al., 1990; Tyagi et al., 2001). La région V (résidus 60 à 72), riche en glutamine, semble être importante pour la régulation de transcription inverse. En effet, par ses domaines riches en glutamines et en cystéine, Tat possède 2 rôles au cours de la RT. *Premièrement*, elle favorise la mise en place du tRNA^{3lys} sur le RNA viral aux stades précoces de l'infection et, aux étapes ultérieures du cycle viral, elle supprime la phase d'élongation du cDNA (Kameoka et al., 2002).

Le transactivateur de la transcription du VIH-1 : Tat

Cette région est aussi décrite pour son rôle dans la polymérisation des microtubules et l'apoptose des lymphocytes T (Mareuil et al., 2005). Ainsi, les 72 premiers acides aminés sont codés par le premier exon, tandis que l'extrémité C-terminale (résidus 73 à 101) est codée par le 2^{ème} exon. Celui-ci a un rôle dans la pathogénèse, en modulant l'expression des MHC de classe I permettant au virus de persister (Howcroft et al., 1993). La région C-terminale comprend, également, la séquence ⁷⁸RGD⁸⁰ (arginine-glycine-acide aspartique), qui est importante pour la liaison de Tat aux récepteurs d'intégrine cellulaires (Brake et al., 1990). Le motif ⁸⁶ESK⁹² dans l'exon II a un rôle dans la transactivation du LTR du VIH-1, par activation de la voie NF-kB (Li et al., 2012a).

La plupart des études structurales obtenues par résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle (RMN) ont montré que Tat est une protéine dépliée. Cependant, ces études n'ont pas permis d'identifier une conformation stable en l'absence de ligand. Des études de mutagenèse ont montré que la structure de Tat est stabilisée par de fortes interactions électrostatiques entre le domaine N-terminal acide et le domaine basique. Néanmoins, elle ne présente pas d'organisation structurale secondaire majeure. Ces résultats indiquent que Tat est une protéine flexible et, intrinsèquement, désordonnée, mais ces caractéristiques n'empêchent pas son interaction avec ses partenaires tels que TAR et la cycline T1. Par examen de la structure cristalline de Tat dans le complexe P-TEFb, seule la structure des 49 premiers acides aminés de Tat a pu être résolue. Cela montre que le reste de la protéine n'est pas impliqué dans cette interaction. Ainsi, Tat peut s'assembler avec divers partenaires pour former des complexes de haute affinité, impliquant chacun une conformation spécifique de Tat (Debaisieux et al., 2012).

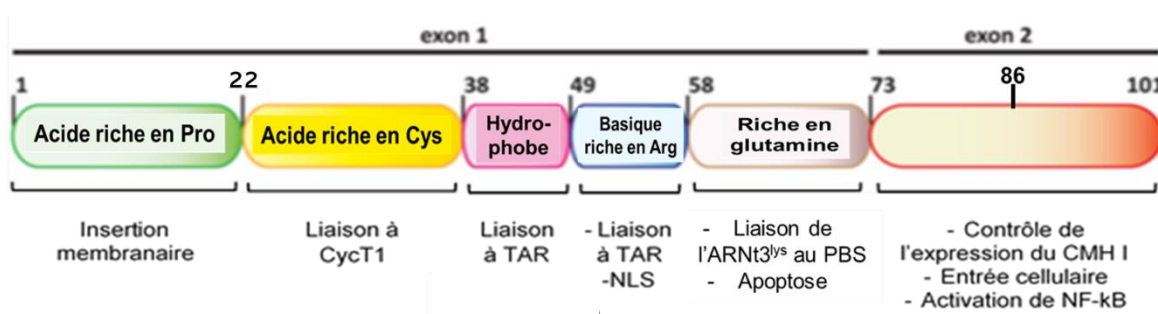


Figure 18 : Diagramme représentant les domaines fonctionnels de Tat ((Clark et al., 2017) avec modification).

2- Import et accumulation nucléaire de Tat

Le domaine basique de Tat, servant de NLS, est responsable de son accumulation dans le noyau (Hauber et al., 1989). L'import nucléaire de Tat se fait par voie classique, impliquant l'importine α , qui lie directement la séquence NLS et l'importine β , qui va médier l'interaction

avec le complexe des pores nucléaires (Cardarelli et al., 2011). Plusieurs nucléoporines et protéines associées aux complexes des pores nucléaires ont été retrouvés dans l'interactome nucléaire de Tat (Gautier et al., 2009). Une fois dans le noyau, Tat s'accumule à l'intérieur des nucléoles (Ruben et al., 1989) ou dans le nucléoplasme (Coiras et al., 2006). Il est possible que cette différence de localisations dépende de la concentration intranucléaire de Tat. En effet, dans des cellules HeLa transfectées de manière stable, l'expression de faibles quantités de Tat-GFP entraîne une localisation dans le nucléoplasme, alors que sa surexpression aboutit à une accumulation nucléolaire (Stauber and Pavlakis, 1998).

3- Accumulation nucléolaire de Tat

L'analyse protéomique des cellules T Jurkat exprimant de façon stable Tat, a démontré des modifications dynamiques de la composition des protéines nucléolaires. Des enrichissements en protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes, des voies métaboliques, de la réplication et réparation du DNA, de la voie ubiquitine-protéasome et la voie SUMO, ont été signalés (Jarboui et al., 2012). La localisation nucléolaire de Tat dépend de la présence du signal de localisation nucléolaire (NoLS). Le NoLS chevauche avec le domaine basique de Tat, et la délétion de cette région conduit à la perte de cette localisation (Kuppuswamy et al., 1989). La localisation nucléolaire de Tat se fait par interaction avec une protéine nucléolaire majeure B23, également appelée nucléophosmine ou NO38 (Li, 1997). Cette accumulation nucléolaire, décrite comme essentielle à la réplication du VIH-1 est nécessaire à sa fonction transactivatrice (Michienzi et al., 2002; Musinova et al., 2016; Subramanian et al., 1990).

4- Activation de la synthèse des transcrits viraux par Tat

L'activation de la transcription du VIH-1 par Tat est dépendante de son interaction avec de multiples facteurs de transcription, qui œuvrent ensemble dans l'élongation de la transcription. En absence de Tat, le provirus n'est pas, efficacement, transcrit et produit des transcrits courts correspondant aux 50 premiers nucléotides. Cependant, en présence de Tat, la transcription augmente de plusieurs centaines de fois, ce qui indique son rôle critique dans l'activation de la transcription. La fonction de Tat est régulée par diverses modifications post-traductionnelles telles que la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination. Comme les modifications post-traductionnelles sont souvent transitoires et réversibles, elles permettent une régulation fine de la fonction Tat pendant la transcription du VIH. De façon intéressante, de nombreuses enzymes, qui modifient Tat, modifient, également, les histones, liant ainsi l'activité transcriptionnelle de Tat au statut transcriptionnel du provirus intégré.

4.1- Activation de la transcription par Tat au travers de son interaction avec P-TEFb

Tat est l'unique facteur de transcription qui se lie à la séquence ²³UCU²⁵, située à 4 nucléotides de la structure en tige boucle du TAR RNA, pour augmenter la transcription virale et favoriser l'élongation. L'uracile en 23 est indispensable pour la liaison de Tat, les deux autres résidus voisins C24 et U25 peuvent être remplacés par d'autres nucléotides, sans affecter la liaison Tat-TAR (Weeks and Crothers, 1991). Comme mentionné au chapitre précédent, Tat s'associe à P-TEFb inactif, et le recrute aux transcrits naissants du génome viral. P-TEFb est, ensuite, déplacé du complexe 7SK snRNP au profit de son interaction avec TAR (D'Orso and Frankel, 2010b; D'Orso et al., 2012). Sinon, Tat est capable de libérer P-TEFb à partir du 7SK snRNP par compétition avec HEXIM1 via son domaine riche en cystéine, avant assemblage au promoteur (Barboric et al., 2007; Schulte et al., 2005b). Tous les mécanismes conduisant au recrutement de P-TEFb au promoteur viral par Tat, sont détaillés dans le chapitre précédent. Une fois liée, la CDK9 phosphoryle le domaine CTD de la RNA Pol II et favorise l'élongation de la transcription (Zhou et al., 2012). Outre le CTD, CDK9 phosphoryle, également, les facteurs négatifs DSIF et NELF pour antagoniser leurs actions inhibitrices d'élongation et déclencher la libération de la Pol II (Fujinaga et al., 2004; Ivanov et al., 2000). P-TEFb peut, également, phosphoryler l'histone H1, et représente ainsi un processus supplémentaire qui favorise la transcription cellulaire et Tat dépendante du VIH-1 (O'Brien et al., 2010). Tat recrute le SEC avec ses différents facteurs (ELL1/2, AFF1/4, ENL et AF9) et travaillent en synergie avec P-TEFb pour augmenter l'efficacité de la RNA Pol II (He et al., 2010), (figure 14).

4.2- Autres rôles de Tat dans la synthèse des transcrits viraux

4.2.1- Interaction de Tat avec les histones acétyltransférase (HATs)

Il a été démontré que Tat cible au moins cinq différentes HATs dans les cellules infectées par le VIH-1 : CBP/p300, PCAF, GCN5, Tip60 et TAFII250. CBP et p300 sont des homologues et agissent comme activateurs transcriptionnels par interaction avec des facteurs de transcription liant le promoteur tel que CREB et PCAF. CBP/p300 peut acétyler tous les résidus lysine, mais préférentiellement les lysines 14 et 18 de l'histone H3 et les lysines 5 et 8 de l'histone H4. PCAF est, étroitement, liée à GCN5 (70-80% d'homologie de séquence) et acétyle la lysine 14 de l'histone H3 ou la lysine 8 de l'histone H4. Tat forme un complexe, à la fois, avec CBP/p300 et PCAF et les oriente au promoteur viral, afin de conduire à un remodelage de la chromatine et créer un environnement favorable à l'activation de la transcription par acétylation des histones H3 et H4. Tat interagit avec TAFII250, un composant du facteur de transcription TFIID et

inhibe son activité HAT nécessaire à la transcription d'autres gènes cellulaires tels que le promoteur MHC de classe I. Initialement, il a été démontré que Tip60 n'influence pas de manière significative l'activation transcriptionnelle Tat-dépendante sur le LTR du VIH. En revanche, en ciblant Tip60, Tat entrave l'expression de gènes cellulaires, qui, normalement, interfèrent avec la réplication et la propagation du virus (pour revue (Easley et al., 2010)).

De plus, outre les histones, un certain nombre de facteurs de transcription cellulaire se sont révélés être les substrats des acétyltransférases. Pour exemple, l'acétylation Tat dépendante de la sous-unité p50 de NF- κ B par p300/CBP aide à sa translocation nucléaire et augmente sa capacité de liaison au DNA et au LTR, avec pour résultat un accroissement de l'activité du promoteur (Furia et al., 2002).

4.2.2- Interaction de Tat avec d'autres protéines impliquées dans la transcription du VIH-1

Tat améliore, également, l'activité transcriptionnelle grâce à son interaction avec Sp1. Les résidus 30-55 de Tat lient Sp1 et l'activent, en induisant sa phosphorylation par l'enzyme de réparation du DNA (DNA-PK : DNA-dependent protein kinase catalytic subunit), ce qui augmente l'expression génique induite par le LTR (Chun et al., 1998a).

Le facteur de transcription TFIID s'est avéré capable de lier le domaine de transactivation de Tat. La capacité de TFIID à phosphoryler la RNA Pol II s'est révélée, significativement, augmentée après sa liaison à Tat. De même, la capacité de transactivation de Tat est renforcée en présence de TFIID (García-Martínez et al., 1997).

L'extrémité N-terminale de Tat (résidus 1-26) se lie, également, au domaine de transactivation de NFAT1 et améliore son activité transcriptionnelle dans les cellules T Jurkat (Macián and Rao, 1999).

L'interaction de Tat avec Vpr améliore l'activité transcriptionnelle du LTR. Des études de co-transfections, utilisant le plasmide rapporteur LTR Luciférase du VIH-1 et le vecteur d'expression de Tat plus Vpr indiquent une super activation du promoteur par Tat et P-TEFb en présence de Vpr. Ces résultats sont liés aux interactions protéiques où Vpr est associé à Tat et à la cycline T1 (Sawaya et al., 2000).

Tat recrute le complexe de remodelage des nucléosomes SWI/SNF au LTR, pour améliorer la transcription du VIH-1. L'interaction Tat-SWI/SNF est régulée par l'acétylation de Tat et la liaison au domaine Bromo des sous-unités BAF180 et BRG1 de ce complexe. En cas d'activation transcriptionnelle, Tat acétylée par p300 va pouvoir recruter le complexe PBAF

avec sa sous-unité BRG1, qui va repositionner les nucléosomes formés en aval du TSS, ce qui permet une élongation efficace de la transcription (Rafati et al., 2011).

Enfin, par un crible double hybride, il a été démontré que Tat interagit avec un facteur NUCKS1 (Nuclear Ubiquitous Casein and cyclin-dependent Kinase Substrate 1) de liaison au DNA et qui semble être important pour le cycle cellulaire, mais dont le rôle exact n'a pas été clarifié. NUCKS1 augmente de manière significative la transcription virale médiée par Tat, améliore l'association Tat/TAR, et contribue à la réactivation du VIH-1 dans les cellules infectées latentes (Kim et al., 2014).

5- Les modifications post-traductionnelles de Tat régulant son activité transcriptionnelle

La plupart des modifications sont trouvées dans la région riche en Arginine de Tat. Ces modifications peuvent conduire à une activation ou une inhibition de Tat. Les enzymes responsables de ces modifications sur Tat ont, également, des effets sur les histones, liant ainsi l'activité transcriptionnelle de Tat au statut transcriptionnel du provirus intégré, (figure 19).

5.1- Les modifications qui inhibent l'activité de Tat

Les modifications inhibitrices comprennent la méthylation de l'arginine par la méthyltransférase PRMT6 (Protein Arginine Methyltransferase 6) et la méthylation de la lysine par SETDB1. PRMT6 est une arginine méthyltransférase nucléaire, qui conduit à une mono ou diméthylation des arginines 52 et 53 (Boulanger et al., 2005; Frankel et al., 2002). Cette méthylation interfère avec la formation du complexe Tat/TAR/P-TEFb, inhibant la fonction de Tat (Xie et al., 2007). Des analyses de fluorescence ont montré que l'accumulation nucléolaire de Tat est empêchée par PRMT6, qui constitue un mécanisme supplémentaire de blocage de l'activité transcriptionnelle de Tat (Fulcher et al., 2016). SETDB1, inhibe la transactivation du promoteur du VIH-1 par méthylation des lysine 50 et 51 de Tat (Van Duyne et al., 2008).

5.2- Les modifications activatrices de Tat

Les modifications activatrices de Tat comprennent la phosphorylation, l'acétylation, la monométhylation et la polyubiquitination.

La phosphorylation de Tat médiée par CDK2 sur les Sérines 16 et 42, est importante pour la transcription du VIH-1 (Ammosova et al., 2006). Tat est aussi phosphorylée aux résidus sérines 62 et 68 et thréonine 64 par la protéine kinase R (PKR). PKR joue un rôle régulateur clé dans la réponse antivirale, en bloquant la traduction dans la cellule infectée par phosphorylation de

Le transactivateur de la transcription du VIH-1 : Tat

la sous-unité alpha du facteur d'élongation eIF2. Le VIH-1 échappe à cette réponse antivirale par la liaison de Tat à PKR. Tat agit comme un substrat de PKR, entre en compétition avec eIF2 α , inhibant ainsi le blocage traductionnel (Endo-Munoz et al., 2005).

L'acétylation de la lysine (K) 28 de Tat est essentielle à sa liaison de haute affinité à TAR et P-TEFb. La K28 est acétylée par l'acétyltransférase PCAF (Brès et al., 2002). L'acétylation de K28 est inhibée par l'histone désacétylase 6 (HDAC6), connue pour désacétyler la tubuline dans les cellules. De plus, l'acétylation de la K28 favorise la stabilisation et la polymérisation du réseau de microtubules par Tat, conduisant à une augmentation de l'apoptose dans les lymphocytes T, par translocation de facteurs pro-apoptotique vers la mitochondrie (Huo et al., 2011).

L'acétylation de Tat sur K50 et 51 par p300/CBP et GCN5, respectivement, (Col et al., 2001; Kiernan et al., 1999; Ott et al., 1999), dissocie le complexe Tat-CyclinT1 de la TAR RNA et contribue à transférer Tat sur la RNA polymérase II en phase d'élongation (Kaehlcke et al., 2003). De plus, l'acétylation de Tat sur ces résidus déclenche l'interaction avec le complexes de remodelage de la chromatine SWI-SNF, qui, comme décrit précédemment, sert à déstabiliser les nucléosomes en aval de la RNA Pol II (Mahmoudi et al., 2006; Rafati et al., 2011). La désacétylation de K50 et 51 de Tat est effectuée par l'histone désacétylase de classe III SIRT1 (Sirtuin 1), (Pagans et al., 2005). Il a été suggéré que la désacétylation de Tat par SIRT1 se produit à la fin du cycle de transcription, et sert à recycler Tat sous sa forme non acétylée pour les prochaines phases de transcription (Pagans et al., 2005).

La 3^{ème} marque d'activation de Tat est la monométhylation de K51 par la monométhyltransférase KMT7 (lysine methyltransferase 7). Cette marque renforce la formation du complexe Tat, TAR et Cycline T1 (Pagans et al., 2010). La K51 est déméthylée par LSD1 (lysine-specific demethylase 1) et renforce l'activité transcriptionnelle de Tat sur le promoteur (Sakane et al., 2011).

Il est surprenant que la mono et la déméthylation de Tat soient toutes deux requises à son activité transcriptionnelle. Ce phénomène s'expliquerait par le fait que la transactivation de Tat semble être un processus à plusieurs phases, où les premières étapes d'activation dépendantes de TAR sont suivies par des étapes tardives indépendantes de TAR. (Ott et al., 2011).

La polyubiquitination de Tat est médiée par la proto-oncoprotéine Hdm2 (Human double minute 2). La K71 de Tat sert de site majeur d'ubiquitination, augmente la transactivation du promoteur viral et soutient l'idée selon laquelle cette ubiquitination ne possède pas de fonction protéolytique sur Tat (Brès et al., 2003). D'autre part, l'ubiquitination de Tat en K48 cible Tat

vers une dégradation par le protéasome, et réduit le potentiel de transactivation de Tat (Zhang et al., 2014).

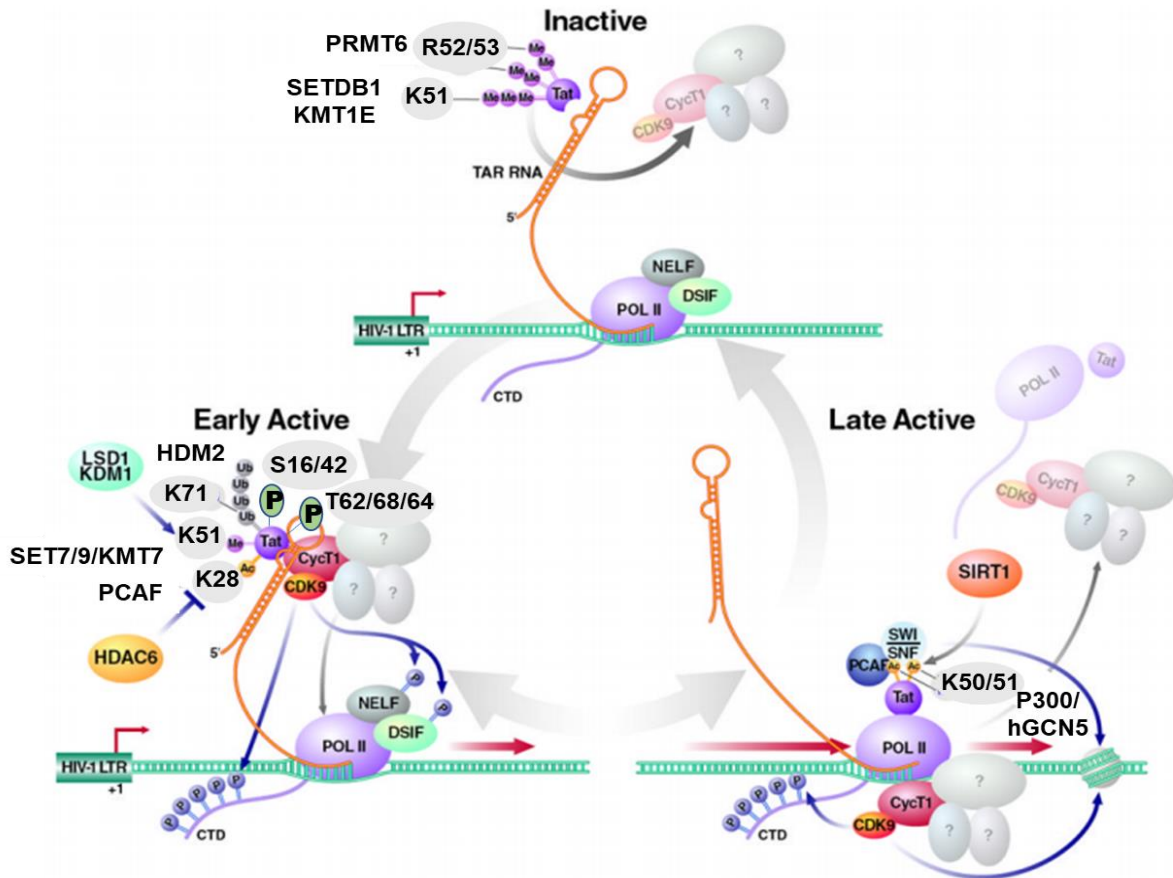


Figure 19 : Régulation de la fonction Tat par modifications post-traductionnelles. Les modifications post-traductionnelles inhibitrices et activatrices de Tat régulent son association avec TAR et P-TEFb au cours des différentes étapes du cycle de transactivation (Ott et al., 2011).

6- Rôle de Tat dans la transcription inverse du VIH-1

Bien qu'il n'ait pas été démontré que Tat soit incorporée dans les virions, de façon surprenante, les variants du VIH-1, portant des mutations dans le gène *tat*, sont incapables d'effectuer une transcription inverse efficace. L'analyse de ces virus a révélé que le RNA viral est sous forme de molécules partiellement dégradées et non dimérisées. Il a été suggéré que la quantité de Tat requise à cette fonction est, extrêmement, faible, rendant sa détection difficile dans les virions (Harrich et al., 1997)(Harrich et al., 1997)(Harrich et al., 1997)(Harrich et al., 1997)(Harrich et al., 1997).

Comme mentionné précédemment, Tat régule la transcription inverse, en favorisant la liaison du tRNA^{3^{lys}} sur le PBS aux stades précoces du cycle viral. Aux étapes ultérieures, Tat supprime la transcription inverse par blocage de la phase d'élongation du cDNA (Kameoka et al., 2002).

7- Tat est une protéine multifonctionnelle

En plus de son rôle clé dans l'infectivité du virus et l'expression du génome viral, Tat peut, également, participer à des processus cellulaires non liés au cycle de réplication du VIH-1 et contribuerait à la physiopathologie de l'infection. Ces phénomènes sont détaillés ci-dessous.

a- Sécrétion et internalisation de Tat

Il a été décrit que la protéine Tat est libérée par des cellules T infectées, et que des quantités d'environ 40 ng/ml ont été détectées dans certains sérums de patients VIH-1 positifs (Westendorp et al., 1995). Le mécanisme de sécrétion de Tat reste encore mal défini et semble dépendre d'une voie sécrétoire non conventionnelle indépendante du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Nickel and Rabouille, 2009).

- Sécrétion de Tat

Des études récentes ont montré qu'avant sa sécrétion, Tat s'accumule à la membrane cellulaire à la fois des cellules infectées par le VIH-1 ou des lymphocytes T CD4+ transfectées par Tat. La sécrétion de Tat est dépendante de la liaison du PI (4,5) P2, qui est essentielle au recrutement de Tat à la membrane cellulaire. Par sa région basique, Tat peut lier PI (4,5) P2, avec une grande affinité. L'insertion membranaire du tryptophane unique de Tat, en position 11, permet de stabiliser l'interaction Tat-PI (4,5) P2 et de favoriser sa sécrétion (Rayne et al., 2010).

Tat est décrit comme un facteur de virulence du VIH-1, jouant le rôle d'une toxine virale, une fois sécrétée par les cellules infectées. Il est rapporté que Tat extracellulaire peut conduire à la production d'anticorps, qui peuvent être corrélés à une réduction de la progression de la maladie (Ensoli et al., 2016). Cependant, il est à préciser que dans cette étude, la quantité vaccinale de Tat, qui a mené à la production de ces anticorps, était de 30 µg (Ensoli et al., 2016).

- Entrée de Tat

Tat peut entrer par endocytose dans divers types cellulaires tels que les lymphocytes, monocytes, macrophages, les cellules dendritiques et endothéliales et les neurones (Fanales-Belasio et al., 2002). Tat se lie à diverses protéines de la membrane cellulaire, tels que CD26, le LRP (lipoprotein Receptor-related Protein), CXCR4, les intégrines, les protéoglycanes de l'héparane sulfate (HSPG) et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Albini et al., 1996; Ghezzi et al., 2000; Gutheil et al., 1994; Liu et al., 2000).

b- Modulation de l'expression des gènes cellulaires et dérégulation immunitaire

Tat régule positivement l'expression des gènes des récepteurs cellulaires comme le récepteur IL-2 (CD25), les corécepteurs CXCR4, CCR5 dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), ce qui est corrélé à une infectivité accrue. En outre, Tat a un effet

inhibiteur sur l'expression du gène codant pour le MHC I, modulant de façon importante l'activation associée aux lymphocytes T CD8+ et la réponse immunitaire à l'infection par le VIH-1 (Matsui et al., 1996; Mayol et al., 2007; Secchiero et al., 1999). Plusieurs études ont démontré que Tat affecte, également, l'expression de diverses cytokines. En effet, elle augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-6 et le TNF α ainsi que l'expression des facteurs de croissance TGF- α et β (Transforming Growth Factor). L'augmentation de TGF- β a entraîné une diminution des protéines anti-apoptotiques, ce qui rend les cellules immunitaires plus sensibles à l'apoptose et à l'immunosuppression (Gandhi et al., 2009). Grâce à sa capacité à activer l'interféron α (IFN- α), Tat peut induire des effets antiprolifératifs et d'immunosuppression des cellules T non infectées (Zagury et al., 1998).

En outre, Tat induit la croissance et la différenciation des cellules T par augmentation des niveaux d'IL-2, favorisant ainsi la propagation du virus (Ehret et al., 2001). Tat augmente, également, l'expression des cytokines anti-inflammatoires IL-4, IL-8 et IL-10, suggérant un mécanisme potentiel de Tat dans la suppression de la réponse immunitaire (Gandhi et al., 2009). Enfin, la génération de la cartographie de liaison de Tat au génome humain dans les cellules T Jurkat, a montré qu'environ 53% des régions cibles de Tat sont dans des séquences répétées de DNA, dont plus de la moitié sont des séquences Alu. Les régions cibles restantes sont situées dans les introns et les régions intergéniques distales. Seulement, 7% des régions liées par Tat sont des sites d'initiation de la transcription (TSS), proches des promoteurs de gènes. De façon intéressante, Tat lie les promoteurs des gènes associés au facteur de transcription ETS1, à l'acétyltransférase CBP et aux régions enrichies en marques d'histone H3 tri-méthylées sur K4 (H3K4me3) ou K27 (H3K27me3) (Marban et al., 2011).

c- Tat module l'expression de gènes viraux autres que le VIH-1

Tat est une puissante protéine transactivatrice dont l'activité n'est pas uniquement limitée aux gènes du VIH-1. Tat régule positivement la transcription de virus oncogènes, tels que le papillomavirus humain (HPV) et le virus du sarcome de Kaposi (KSHV) (Aoki and Tosato, 2004; Nyagol et al., 2006). Tat est capable de transactiver la région LCR (Long Control Region), qui régule l'expression des protéines oncogènes E6 et E7 d'HPV, favorisant ainsi la carcinogenèse cervicale du virus (Nyagol et al., 2006). Tat agit, aussi, en synergie avec le FGF β (Fibroblast Growth Factor β) pour induire l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire et l'œdème, qui caractérisent la progression du sarcome de Kaposi (Ensoli et al., 1994).

d- Régulation de l'apoptose

Des études, *in vitro*, ont montré, qu'au cours de l'infection, Tat est capable d'induire l'apoptose dans un certain nombre de lignées cellulaires humaines. Tat, extracellulaire, a des effets

neurotoxiques par induction d'une mort neuronale, en se liant au récepteur LRP à la surface des neurones (Wong et al., 2005). Tat est capable de se lier aux microtubules polymérisés, avec, pour conséquences, leur stabilisation, la prévention de leur dépolymérisation et l'induction de la libération du cytochrome C par les mitochondries, qui déclenche l'apoptose (Mareuil et al., 2005). De plus, Tat augmente l'expression des facteurs clés de la voie apoptotique, comme la caspase 3 et 8, TRIAL (Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Induced Ligand), Fas et Fas ligand (FasL/CD95L) et le TNF- α (Tumour necrosis factor α) (Romani et al., 2010).

e- Rôle de Tat dans la neurotoxicité et la démence associée au VIH-1

Le VIH peut pénétrer et infecter le système nerveux central (SNC), causant ainsi une variété de troubles neurologiques, dénommés troubles neurocognitifs associés au VIH (HAND : HIV-Associated Neurocognitive Disorder) (Mocchetti et al., 2012). Ces troubles sont causés par des lésions dans le tissu nerveux, dues, à la fois, aux effets cytopathiques et à la réponse inflammatoire de l'infection (Marcondes et al., 2001). Tat est présent à un niveau, relativement, élevé dans le SNC des patients et joue un rôle critique dans l'effraction de la barrière hémato-encéphalique (BBB : Blood-Brain Barrier). Tat peut traverser la BBB, en diminuant l'expression des protéines des jonctions serrées et de la matrice extracellulaire (András and Toborek, 2011). Après passage au travers de la BBB, Tat est, efficacement, prise en charge par les neurones, ce qui entraîne la libération de plusieurs facteurs solubles, qui favorisent la neuroinflammation. Tat augmente l'expression du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF : Platelet-Derived Growth Factor), un puissant inducteur de la protéine chimiotactique des monocytes MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) (Bethel-Brown et al., 2012). L'induction de MCP-1 déclenche un afflux de monocytes infectés par le VIH, ce qui conduit à l'expression d'IL-1 β dans les astrocytes et amplifie les réponses toxiques dans le SNC (Bethel-Brown et al., 2011). De plus, Tat peut augmenter les niveaux des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) et l'activation des caspases, qui entraînent l'apoptose des neurones et favorisent les maladies neurodégénératives (Pocernich et al., 2005).

f- Coordination de l'expression génique

L'interactome nucléaire de Tat a mis en évidence ses propriétés et a, particulièrement, permis sa classification fonctionnelle en tant que protéine polyvalente, impliquée dans des processus biologiques, qui comprennent (Gautier et al., 2009) :

- La régulation de l'expression des gènes, reflétée par son interaction avec des activateurs transcriptionnels tels que le complexe SET1 de méthylation de l'H3K4, le complexe FACT, qui permet la processivité de la RNA Pol II et des complexes de remodelage de la chromatine BAF53, TRRAP/p400, SWI2/SNF2 et WICH. Tat est, également, retrouvée

parmi des complexes répresseurs transcriptionnels SIN3/HDAC, NuRD, MeCP1 et les complexes polycombes PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2).

- La réplication et l'organisation des chromosomes, représentées par son interaction avec : les Condensin/Cohesin et le TOPOSOME, impliqués dans la condensation et la cohésion des chromosomes, l'appariement des chromatides et la ségrégation des chromosomes lors de la mitose ; les MCM (Minichromosome Maintenance) et ORC (Origin of Replication Complex) importantes à la réplication du DNA.
- L'architecture nucléaire, par interaction avec les composants du NPC et la LAMINA nucléaire.

8- Tat : une cible thérapeutique

La protéine Tat du VIH-1 est longtemps restée une cible attrayante pour l'intervention thérapeutique. Plusieurs approches, ciblant la TAR RNA, l'interaction Tat-P-TEFb ou directement la protéine Tat, ont été développées. A l'heure actuelle, il n'y a pas de structure cristalline du complexe Tat/TAR, seules les structures de petits ligands ou des peptides dérivés de Tat, qui interagissent avec TAR, existent pour guider la conception d'inhibiteurs (Mousseau et al., 2015). WM5 (6-aminoquinolone) est l'un des inhibiteurs les plus intéressants de TAR, rapportés à ce jour. Il est capable de bloquer, spécifiquement, l'interaction Tat/TAR, en se liant à TAR et d'inhiber la réplication virale dans les PBMCs. Cependant, il présente un faible index thérapeutique (Tabarrini et al., 2004). D'autres études ont rapporté que la didéhydro-cortistatine A (dCA) inhibe la transactivation médiée par Tat, en se liant au domaine d'interaction de Tat avec TAR (Mousseau et al., 2012). La dCA retarde le rebond viral en l'absence de thérapie antirétrovirale dans les isolats de lymphocytes T primaires de patients infectés. Ainsi, la dCA peut représenter une nouvelle classe de traitements antirétroviraux ciblant la transcription du VIH-1. D'autres essais précliniques et cliniques seront nécessaires pour évaluer l'efficacité et la toxicité de cet agent (Mousseau and Valente, 2016). Les molécules qui inhibent Tat, par interaction directe, par dégradation, ou par modification structurale, sont rares. Deux petites molécules inhibant l'activation de la transcription du VIH-1 par Tat ont été identifiées : la cyclopentenone prostaglandin 15d-PGJ2 et celastrol. Les études *in vitro* montrent que ces 2 molécules interfèrent sur le recrutement de P-TEFb par Tat. Cependant, en raison de leur toxicité, l'utilisation de ces 2 composés nécessite une optimisation pour augmenter leur index thérapeutique (Kalantari et al., 2009; Narayan et al., 2011). Un autre groupe a rapporté que le triptolide qui est actuellement en phase II d'essais cliniques, était capable d'inhiber la transcription du VIH-1, en accélérant la dégradation de Tat (Wan and Chen, 2014).

La pathogénie du VIH-1

1- Transmission du VIH-1

Le virus du VIH-1 peut être transmis de différentes manières. Plus de 80% des adultes infectés par le VIH-1 l'ont été suite à l'exposition de leurs muqueuses au virus. La plupart des 20% restants ont été infectés par des inoculations percutanées ou intraveineuses. Les facteurs, les plus importants, qui augmentent le risque de transmission sexuelle du VIH-1 sont la charge virale de l'individu contaminant et l'état des muqueuses de l'individu infecté (Quinn et al., 2000).

a- La transmission par les muqueuses

Pendant les rapports sexuels, le VIH entre dans le corps principalement en traversant les barrières épithéliales couvrant les muqueuses des voies génitales ou rectales. Au cours des rapports sexuels, la transmission du VIH de l'homme à la femme est plus efficace qu'une contamination de l'homme par la femme, et fait de ces dernières une population plus sensible à l'infection. Les co-infections, sexuellement transmissibles avec *N. gonorrhoea*, *C. trachomatis*, *T. vaginalis* et *HSV-2*, sont associées à une augmentation de la transmission du VIH-1 à travers le tractus génital féminin (Schust et al., 2012).

Il est décrit que la circoncision chez les hommes fournit une barrière protectrice contre l'infection (Gray et al., 2007). L'épithélium rectal représente la voie prédominante de transmission du VIH chez les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (Tebit et al., 2012).

b- La transmission par voie sanguine

Ce mode de transmission est, principalement, retrouvé chez les toxicomanes, qui partagent les seringues d'injection de drogues. La contamination par transfusion sanguine a disparu par la mise en place de tests de dépistage systématique des dons de sang.

c- La transmission verticale

La transmission mère-enfant du VIH est le mode de transmission vertical de ce virus. Il peut être acquis in utero, pendant l'accouchement, ou par l'allaitement maternel. Bien que la transmission mère-enfant ait été réduite à moins de 1% aux États-Unis et en Europe, les taux de transmission dans de nombreux pays en développement et dont les ressources sont limitées fluctuent entre 10 et 40%. La transmission in utero survient, principalement, à travers le placenta de la mère et, presque toujours, au cours des trois derniers mois de la période gestationnelle. Une forte charge plasmatique chez la mère de même qu'une infection

bactérienne dans le placenta sont souvent associées à une transmission élevée. A l'accouchement, les nouveau-nés sont, facilement, exposés au sang maternel et aux sécrétions génitales. La charge virale génitale, l'ulcère génital et la rupture de la barrière placentaire sont associés à une transmission à l'accouchement.

L'allaitement maternel est un facteur de risque majeur pour la transmission du VIH-1. Le risque de transmission est plus élevé au début de la lactation, en raison d'une élévation de la charge virale dans le colostrum. Cependant, ce risque persiste tout au long de l'allaitement, et est lié à la charge virale et aux faibles taux de CD4 maternels. Les nourrissons continuent à être infectés par le VIH-1 chaque année, en dépit de l'extension considérable de la prophylaxie antirétrovirale maternelle. Cependant, la prophylaxie antirétrovirale seule ne pourra pas éliminer les infections pédiatriques à VIH-1. Le développement de stratégies immunologiques, comme un vaccin maternel ou infantile, ou une immunisation infantile, avec des anticorps neutralisants, sera probablement nécessaire pour obtenir une génération sans VIH-1 (Chen et al., 2011).

2- Evolution clinique de l'infection à VIH-1

La pathogénèse de l'infection par le VIH et la progression vers le SIDA sont les conséquences des propriétés du virus infectant et de la réponse immunitaire de l'hôte. L'évolution de l'infection peut être divisée en 3 phases : la primo-infection, la phase d'infection chronique et la phase SIDA, (figure 20).

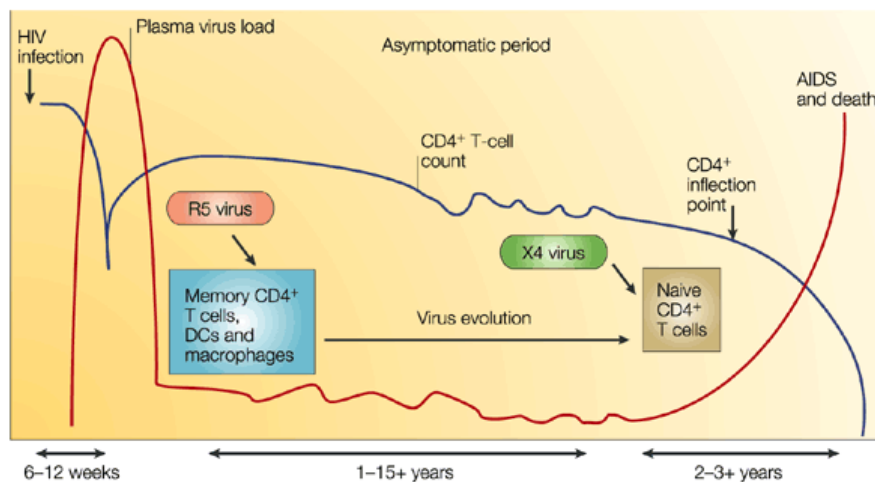


Figure 20 : Evolution clinique de l'infection par le VIH-1. Le taux de lymphocytes T CD4+ varie au cours de l'évolution de l'infection, de même que la charge virale plasmatique. Ces variations correspondent aux différentes phases de l'infection : la primo-infection, la phase asymptotique et le stade SIDA (Rowland-Jones, 2003).

Il est à noter qu'une phase d'éclipse ou fenêtre sérologique, pendant laquelle le virus se réplique librement et se propage du site initial de l'infection aux nombreux tissus et organes, se produit

pendant les 2 premières semaines suivant l'exposition au virus. La virémie est indétectable, et ni la réponse immunitaire, ni les symptômes d'infection ne sont encore visibles.

a- La primo-infection

La primo-infection est associée à un syndrome clinique de type mononucléose aiguë, qui apparaît environ 3 à 6 semaines après l'infection. Cependant, la majorité des individus infectés ne signalent pas un tel symptôme. Un syndrome aigu, associé à la primo-infection, est accompagné d'une virémie plasmatique, qui augmente rapidement, pouvant atteindre 10^6 à 10^7 virions par millilitre. En association à ces forts taux de virémie, qui indiquent que l'individu a acquis le potentiel de transmission du virus, le nombre de lymphocytes T CD4+ diminue de façon spectaculaire. Ces niveaux élevés de virémie sont de courte durée, puisque l'hôte génère des réponses immunitaires humorales et cellulaires, qui contrôlent partiellement la réplication virale : il s'agit de la séroconversion. La virémie diminue jusqu'à atteindre un niveau stable, inférieur au seuil de détection, et les lymphocytes T CD4+ augmentent à nouveau, mais restent inférieurs aux niveaux précédents l'infection. Il est à noter, que c'est pendant cette phase d'infection primaire, que le pool de cellules infectées de façon latente est établi. Ces cellules infectées latentes représentent un obstacle majeur à l'éradication complète de l'infection (Chun et al., 1998b; Fanales-Belasio et al., 2010).

b- La phase d'infection chronique

Quelques semaines après l'infection aiguë, les personnes infectées entrent dans une période clinique asymptomatique, pouvant durer 15 ans. Elle est associée à des niveaux bas de virémie et à l'absence de symptômes, (figure 20). Malgré la réplication intense du virus durant cette phase, l'action antivirale exercée par les réponses immunitaires innées et adaptatives permettent de contrôler la charge virale. Le virus continue à se répliquer en contrecarrant l'immunité antivirale, en induisant un état d'inflammation systémique chronique. Au cours de cette période, les effets pathogènes du VIH-1 persistent et induisent une perte lente mais progressive des lymphocytes T CD4+ et une altération du système immunitaire. Cependant, il est rapporté que certains patients, qui disposent d'une réponse immunitaire plus active, contrôlent, efficacement, l'infection et présentent une charge virale indétectable, le déclin de lymphocytes n'est pas visible. Ces patients ont été appelés non-progresseurs à long-terme (LTNP Long-Terme Non-Progressors) et présentent une phase chronique plus longue (jusqu'à 20 ans) (Poropatich and Sullivan, 2011). Un gros intérêt a, également, porté sur l'identification d'individus capables de supprimer la réplication du VIH à des niveaux où la charge virale reste indétectable en l'absence de traitements. Ces personnes sont généralement appelées élites contrôleurs (Okulicz and Lambotte, 2011). Ces 2 groupes de patients font l'objet d'intenses études, dans le but de

comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'infection (Ford et al., 2009; Rodés et al., 2004).

c- La phase SIDA

La poursuite de la progression de la maladie dépend de la capacité de l'hôte à contenir la réplication du virus et à reconstituer le pool de cellules T. En l'absence de contrôle de la réplication virale, la destruction du système lymphoïde progresse, et le nombre de lymphocytes T CD4⁺ continue à chuter à des niveaux (< 200 cellules/ μ l) qui permettent l'établissement d'infections opportunistes, qui peuvent s'avérer mortelles. Une encéphalopathie progressive, induite par le VIH ou les infections opportunistes, sont, également, associées à une invalidation sévère et à un risque accru de mortalité (Fanales-Belasio et al., 2010).

3- Les premières cibles de l'infection, de l'amplification et de la dissémination virale

Les DC des muqueuses de surfaces (anus et amygdales) ne constituent pas des cibles primaires pour l'infection et la réplication du virus (Moyes et al., 2016). Les cibles primaires de la réplication du VIH sont des lymphocytes T CD4⁺ mémoires exprimant le corécepteur CCR5. La façon dont le virus atteint ces cellules, qui sont abondantes dans le tissu conjonctif situé sous les épithéliums qui tapissent les muqueuses (Lamina propria), varie selon l'itinéraire et le site de transmission.

Dans le cas de la muqueuse rectale, le virus traverse l'épithélium soit par de petites brèches dans les muqueuses, soit par des cellules M (microfold cells), situées dans l'épithélium intestinal. Le virus rencontrera une densité élevée de cellules cibles primaires, qui vont autoriser des niveaux significatifs de réplication virale. Il est à noter que les cellules M forment une poche intra-épithéliale contenant des lymphocytes T CD4⁺ mémoires et des DC, qui faciliterait grandement la réplication du VIH. Après réplication locale et amplification, le virus et les cellules infectées migrent vers les ganglions lymphatiques drainants, puis vers le reste du corps.

Peu d'études ont porté sur la transmission du VIH à partir de la muqueuse anale, mais les données obtenues à partir des études sur la transmission vaginale sont instructives, en raison de la structure similaire de ces tissus. Dans ce contexte, les DC intra-épithéliaux semblent jouer un rôle majeur, car elles peuvent transporter rapidement le virus vers les ganglions lymphatiques régionaux, (figure 21). Dans ce cas, il semble que la propagation aux ganglions lymphatiques régionaux se produit avant qu'il n'y ait une réplication locale significative du virus. Contrairement à la transmission par la voie des muqueuses, qui constitue une barrière sélective, basée sur la capacité du virus à interagir avec les cellules cibles, la transmission

intraveineuse ne cause pas une telle barrière. Le virus se dissémine rapidement dans tous les tissus. Combinées, ces données suggèrent que la réplication dans les tissus muqueux est, non seulement importante pour la transmission, mais aussi critique pour la réplication virale initiale et l'amplification (pour revue (Lackner et al., 2009).

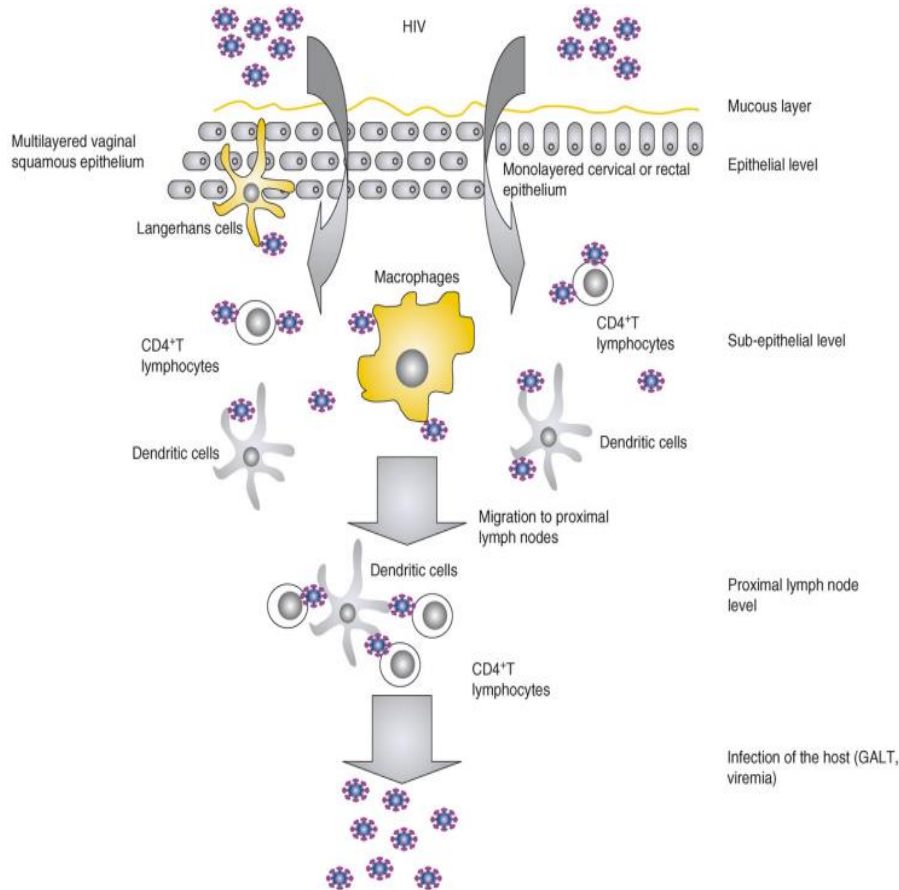


Figure 21 : Modèle de passage du VIH-1 au travers de la barrière muqueuse. Le VIH est surtout transmis pendant les rapports sexuels. La muqueuse vaginale est composée d'un épithélium multicellulaire stratifié, alors que les muqueuses cervicales et rectales ont un revêtement cellulaire monocouche. Le virus traverse la barrière muqueuse par trois mécanismes possibles : par transcytose à travers la couche intraépithéliale, par capture par les dendrites des DC ou par diffusion à travers les espaces intercellulaires de l'épithélium et attachement aux cellules de Langerhans (LC). Dans le troisième mécanisme les particules peuvent perturber les jonctions serrées de la membrane pour la traverser. Pendant et après le passage des épithéliums muqueux, le VIH infecte les LC, les DC et les macrophages, ainsi que les lymphocytes T CD4+. Les cellules infectées migrent, alors, vers les organes lymphoïdes (Piguet and Steinman, 2007).

4- Les cibles cellulaires du virus

4.1- Les cellules dendritiques

Les DC font partie de l'immunité innée et sont des régulateurs clés de la réponse de l'hôte à l'infection. Les DC capturent et internalisent les agents pathogènes pour présenter l'antigène sur le complexe majeur d'histocompatibilité. Elles coordonnent les réponses immunitaires, servant de liens critiques entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (figure 22).

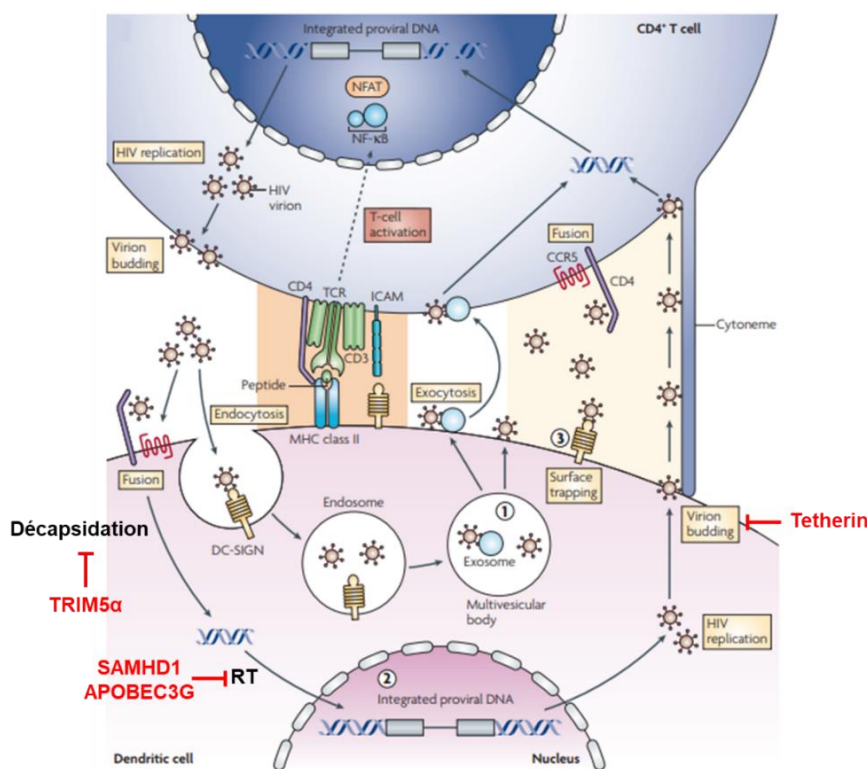


Figure 22 : Voies de passage du VIH-1 entre les DC et les cellules T. Les DC peuvent stocker le VIH-1 sous trois formes : (1) sous forme de virions intacts endocytés dans des corps multivésiculaires, après interaction avec DC-SIGN, (2) sous forme de provirus intégré, ce qui conduit à une infection productive des DC, (3) ou sous forme de virions intacts, liés à la surface à DC-SIGN. Le passage du VIH-1 des DC aux cellules T CD4⁺ se produit le plus efficacement dans des synapses infectieuses, où le virus est libéré soit par exocytose de virions stockés à partir de corps multivésiculaires, soit par bourgeonnement de virions nouvellement formés ou à partir de virus adsorbés à DC-SIGN. Les DC présentent, également, des antigènes aux cellules T, en faisant intervenir des récepteurs importants pour la stimulation des T CD4⁺. Plusieurs facteurs de restriction, empêchant la propagation du VIH-1 et agissant à différents stades du cycle viral sont décrits (Hladik and McElrath, 2008) avec modifications).

Lors de la capture des antigènes dans les tissus, les DC sont soumises à une maturation pendant laquelle elles régulent les molécules à leur surface (HLA II, CD80, CD83, CD86 et CD40). Ces molécules sont importantes pour la présentation de l'antigène, la capacité de migrer vers les organes lymphoïdes drainant et la stimulation des lymphocytes T. Ainsi, les DC migrent de la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires, où ils peuvent induire des réponses aux lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺. Il est décrit différents types de cellules dendritiques caractérisées par une localisation et une expression de récepteurs de surface spécifique. Dans la peau et les muqueuses, 3 sous-types de cellules dendritiques sont décrits : les cellules de langerhans épidermiques CD207⁺ (LCs), exprimant, spécifiquement, la langerine, les DC dermiques CD14⁺, dont certaines expriment DC-SIGN et les DC CD14-CD207- CD1a⁺. Dans le sang périphérique, il existe deux sous-types majeurs de DC : les DC myéloïdes CD11c⁺ (mDC) et les DC plasmacytoïdes CD11c-CD123⁺ (pDC), qui produisent une grande quantité d'IFN de type I, en réponse à un antigène étranger (Ahmed et al., 2015).

L'infection des DC est inférieure et moins productive que celle des cellules T CD4+. La faible productivité du VIH-1 dans les DC est liée à une plus faible expression des récepteurs et corécepteurs du VIH-1, une dégradation rapide du virus dans les compartiments intracellulaires et l'expression de facteurs qui bloquent sa réplication. Néanmoins, en raison de leur localisation, les DC agissent comme des cibles précoces du virus, et contribuent à la propagation de l'infection aux cellules T CD4+ par les synapses infectieuses, comme mentionné précédemment. L'absorption virale se produit principalement par endocytose après liaison aux CLR (C-type Lectin Receptors : DC-SIGN, Langerine, CLEC4A), (figure 22).

Toutefois, il est démontré que l'interaction entre le VIH-1 et ses récepteurs de liaison sur les DC est assez complexe, car des résultats opposés sont observés entre les CLR des LC et les DC. Le VIH-1 capturé par la Langerine des LC est internalisé dans les granules de Birbeck et dégradé. Ainsi, la Langerine inhibe l'infection des LC et les rend réfractaires à la transmission du VIH-1 (Bracq et al., 2018).

Bien que les DC soient un véhicule pour la trans-infection, elles sont, elles-mêmes, faiblement infectées. Plusieurs facteurs de restrictions à l'infection sont décrits comme TRIM5 α (Tripartite Motif-5 α), qui se lie à la capsid virale pour accélérer son désassemblage, APOBEC3G et SAMHD1 (Sterile Alpha Motif domain and HD domain-containing protein 1), qui constitue le facteur de restriction le plus puissant des DC. SAMHD1 fonctionne comme une désoxynucléoside triphosphate triphosphohydrolase, qui bloque, de façon puissante, la transcription inverse, en réduisant le pool de dNTP. Enfin, tetherine empêche le bourgeonnement et la libération virale en attachant le virus à la surface cellulaire (Imran et al., 2016), (figure 22).

Des études ont montré que les pDC sont les premières cellules à arriver sur le site d'infection et sont, rapidement, activées pour sécréter des cytokines inflammatoires, particulièrement l'IFN α , et des chimiokines attirant les cellules T. Au cours du stade chronique de l'infection, l'activation persistante des pDC entraîne la production d'une quantité explosive d'IFN- α , qui contribue à l'inflammation et à l'apoptose des cellules T CD4+. Nef et Vpr contribuent au renforcement de cette activation, qui conduit au développement du SIDA et à d'autres comorbidités, telles que les insuffisances hépatique, rénale et cardiaque (pour revue (Ahmed et al., 2015; Imran et al., 2016; Miller and Bhardwaj, 2013)).

4.2- Les lymphocytes T

Le récepteur CD4 est nécessaire à l'infection cellulaire par le VIH-1. Une robuste infection des cellules est limitée à celles exprimant CD4. La fonction normale de CD4 est d'agir comme un

corécepteur avec le récepteur des cellules T, en se liant au MHC de classe II des cellules présentatrices d'antigène. Les lymphocytes T CD4⁺ expriment, également, les corécepteurs CCR5 et CXCR4 nécessaires à l'infection, mais sont hétérogènes dans cette expression. On peut distinguer les lymphocytes T CD4⁺ activés et quiescents, (figure 23).

a- Les lymphocytes T CD4⁺ activés

Dans une cellule T activée, la réplication virale est rapide et efficace. Après contact avec les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques et macrophages), les lymphocytes T CD4⁺ vont être activés et proliférer. Dans ces conditions optimales, l'infection est cytopathique et réduit, considérablement, la durée de vie de ces cellules, dont la demi-vie est de quelques jours (Pan et al., 2013).

b- Les lymphocytes T CD4⁺ quiescents

Les cellules T CD4⁺ quiescentes sont de 2 types : naïves (CD45RA) et mémoires (CD45RO). L'activation des lymphocytes T naïfs, au repos, donne naissance à des lymphocytes T effecteurs, dont la plupart meurt pendant la réponse immunitaire. Cependant, certains retournent à un état de repos et deviennent des cellules T mémoires. Dans le sang périphérique, les cellules mémoires et non les cellules naïves expriment des niveaux significatifs de CCR5, tandis que CXCR4 est exprimé à des niveaux, relativement, élevés, à la fois, sur les cellules T CD4⁺ mémoires et naïves (Swanstrom and Coffin, 2012). Il est démontré qu'*ex vivo* les lymphocytes T CD4⁺ mémoires sont les cellules, majoritairement, infectées. En revanche, les T CD4⁺ mémoires, en différenciation terminale, contiennent 10 fois moins de copies de DNA viral.

L'infection des lymphocytes T CD4⁺ naïfs est rare et se limiterait, principalement, aux cellules T périphériques, qui ont proliféré (Brenchley et al., 2004). Cependant, ces cellules sont réfractaires à la réplication virale *in vitro*. Il est soupçonné que dans ces cellules, le provirus existe dans un état de latence pré-intégrative, en raison du blocage de l'étape de transcription inverse, dû aux faibles pools de nucléotides et des niveaux d'ATP (Stevenson et al., 1990). Bien que le DNA viral non intégré puisse supporter de faibles niveaux d'expression du VIH, il peut générer quelques transcrits de RNA et le facteur Nef, qui peut créer des conditions permettant la réplication dans des cellules quiescentes. Les macrophages infectés libèrent, de manière dépendante de Nef, des facteurs solubles comme MIP-1 β , TNF α , IL-1 β et IL-6 qui rendent les cellules T sensibles à l'infection. Récemment, il a été démontré que ces formes circulaires, non intégrées, peuvent constituer une réserve pour une intégration de novo, et être une source de virus infectieux (Thierry et al., 2016).

Une forme plus stable de latence survient dans les lymphocytes T CD4⁺, qui portent un provirus intégré. Il s'agit de la latence post-intégrative, qui résulte du retour d'une cellule T activée

infectée à un état de repos (mémoire). Les cellules T CD4+ mémoires infectées latentes, dérivées du sang périphérique de patients sous thérapie anti-rétrovirale avec une virémie indétectable, peuvent réactiver leur virus, après stimulation. Ainsi, ces cellules T CD4+ mémoires représentent un véritable réservoir viral inductible (Han et al., 2004). La latence virale et les réservoirs seront détaillés dans la partie latence virale.

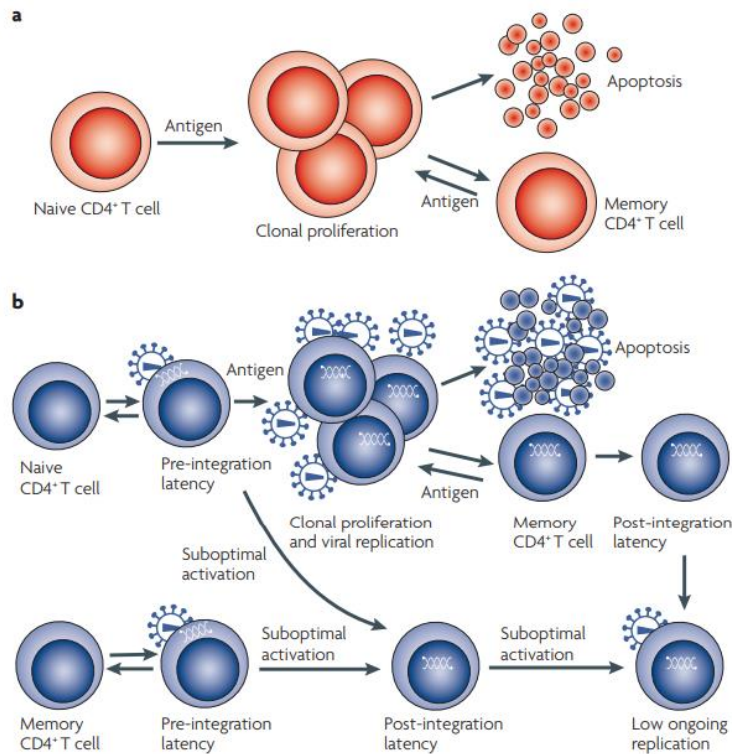


Figure 23 : Réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T. (A) Après stimulation avec des antigènes spécifiques, les T CD4+ naïfs prolifèrent pour produire des cellules T effectrices, dans le but de détruire le pathogène. Au fur et à mesure que l'antigène diminue, les cellules T subissent une apoptose ou se différencient en cellules mémoires, en attendant le contact avec le même antigène. (B) L'infection des lymphocytes T naïfs conduit à l'accumulation de cDNA bicaténaire non-intégré, qui peut être dégradé en l'absence d'activation. Cependant, si ces cellules sont stimulées par leur antigène, elles prolifèrent, permettant l'intégration du génome viral et sa réplication. Au fur et à mesure que l'antigène diminue, la plupart des lymphocytes T effecteurs infectés meurt par apoptose, mais certains restent sous forme de lymphocytes T mémoires contenant un provirus permanent dans leur génome, induisant un état latence post-intégrative. Une réplication continue, à faible niveau, responsable de la virémie résiduelle se produit dans ces cellules, même en l'absence d'activation, comme cela est, également, le cas dans des cellules très stables telles que les macrophages (Coiras et al., 2009).

c- *Les lymphocytes T CD8+*

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) ont un rôle critique dans le système immunitaire adaptatif, en interagissant avec les molécules MHC-I. La diminution de la charge virale, après infection aiguë, est attribuable, en grande partie, aux CTL. La plupart des CTL sont des lymphocytes T CD8+ effecteurs, qui tuent les cellules cibles par une voie cytotolytique ou non. La voie cytotolytique comprend : Fas, FasLigand et l'exocytose de granules perforines et granzyme B. La voie non cytotolytique fonctionne, principalement, par la sécrétion de β

chemokine qui bloque l'entrée virale. Cependant, les cellules T CD8⁺ ne contrôlent pas durablement le virus dont l'exposition chronique les rend dysfonctionnelles. Les lymphocytes T CD8⁺ n'ont pas de mémoire fonctionnelle efficace, spécifique du VIH, même après exposition aux DC matures. L'expression du récepteur NKG2D, essentielle à la fonction effectrice des CTL, est réduite par le virus. Ainsi, NKG2D pourrait constituer une option thérapeutique par amélioration de son expression dans les lymphocytes T CD8⁺. L'échappement du VIH-1 à la cytotoxicité, médiée par les CD8⁺, est aussi liée aux taux de mutations élevées, générées par la RT virale (pour revue (Imran et al., 2016)).

4.3- Les lymphocytes B

Les lymphocytes B et leurs anticorps sont les éléments centraux de l'immunité humorale. Elles se différencient en cellules plasmiques, sécrétrices d'anticorps, et en lymphocytes B mémoires. Dans le cadre du système immunitaire adaptatif, les lymphocytes B protègent contre une grande variété d'agents pathogènes. Des interactions directes entre le VIH et les lymphocytes B ont déjà été rapportées. La réplication continue du VIH induit des dysfonctionnements directs et indirects de ces cellules, (figure 24).

a- Les effets directs du VIH sur les lymphocytes B

In vivo, peu de preuves sur la réplication productive du VIH dans les lymphocytes B sont rapportées dans la littérature. Cependant, il existe de fortes preuves que le VIH se lie à ces cellules *in vivo* par des interactions entre le récepteur CD21 du complément, qui est exprimé sur la plupart des lymphocytes B matures, et les protéines de complément liées aux virus circulants. Cette interaction conduit à l'activation des lymphocytes B, leur déplétion par apoptose et facilite la transmission du VIH (Haas et al., 2011).

b- Les effets indirects du VIH sur les lymphocytes B

L'infection par le VIH et la progression de la maladie est corrélée à l'hyperactivation des lymphocytes B, qui se caractérise par : une hypergammaglobulinémie, une hyperactivation polyclonale, une augmentation du renouvellement cellulaire, une différenciation des cellules B en plasmablastes, une production d'autoanticorps et par une fréquence des cancers des cellules B. Plusieurs cytokines et facteurs de croissance sont responsables de cette activation tels que : l'IFN α , le TNF, l'IL-6, l'IL-10, le CD40 ligand et BAFF (B cell activating factor). Le LPS, libéré dans la circulation à la suite de dommages des tissus intestinaux en raison de l'épuisement des lymphocytes T, est, également, décrit comme activateur des lymphocytes B. De même, les protéines virales, gp120 et Nef semblent activer les lymphocytes B. La gp120 se lie aux lectines de type C, exprimées sur les lymphocytes B, et induit une commutation de classe

d'immunoglobuline. A l'inverse, Nef, sécrétées par les cellules infectées, pénètre et s'accumule dans les lymphocytes B pour inhiber la commutation de classe d'immunoglobulines. D'autre part, Nef peut favoriser l'activation des cellules B polyclonales et augmenter la permmissivité des cellules T CD4+ (pour revue (Moir and Fauci, 2009)).

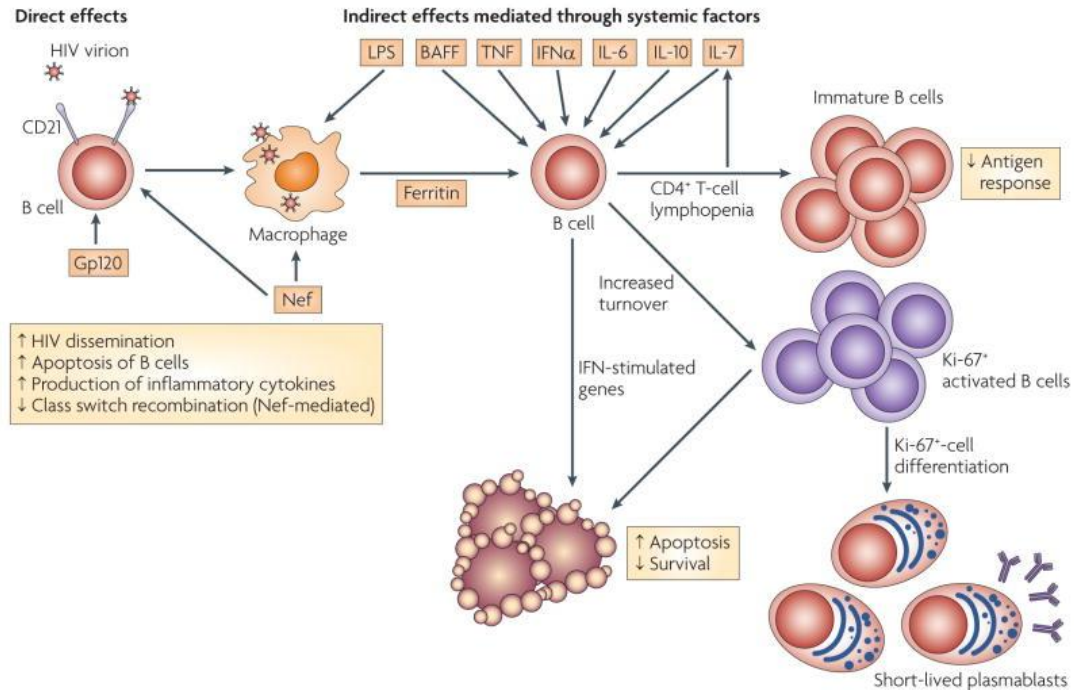


Figure 24 : Effets du VIH-1 sur les lymphocytes B. La réplication du VIH-1 induit une dysrégulation globale des cellules B avec une hyperactivation et une augmentation de l'apoptose (Moir and Fauci, 2009).

4.4- Les monocytes et les macrophages

Les monocytes se trouvent dans le sang et migrent vers les tissus où ils se différencient en macrophages. Avec les lymphocytes T CD4+, les cellules de lignées monocytes-macrophages sont considérées comme les premières cibles de l'infection par le VIH-1. Ces cellules présentent, à la fois, le récepteur CD4 ainsi que les corécepteurs CCR5 et CXCR4 à leur surface. Bien que ces cellules expriment les récepteurs et corécepteurs du VIH-1, elles sont plus résistantes à l'infection et à l'effet cytopathogène du virus. Cela est dû à une inefficacité globale dans chacune des étapes du cycle viral, allant de l'entrée à l'intégration du DNA proviral, à l'exception de la décapsidation (Swanstrom and Coffin, 2012).

a- Blocage de la réplication virale dans les monocytes et les macrophages

Il est souvent décrit que le contrôle de l'infection virale dans les monocytes se produit pendant les premières phases de l'infection, dès l'entrée virale, (figure 25). Plusieurs travaux suggèrent que ce blocage se produit avant la transcription inverse, tandis que d'autres suggèrent une détérioration post-reverse transcription, avant l'intégration. Ainsi, ce qu'il faut savoir c'est que

l'infection des monocytes *in vitro* est limitée par les faibles taux de CD4 à leur surface. Cependant, leur différenciation est associée à une augmentation de l'expression de CCR5 et à une sensibilité accrue des macrophages dérivés à l'infection virale (Tuttle et al., 1998).

La transcription inverse est restreinte dans les monocytes en raison d'une disponibilité limitée de précurseurs nucléotidiques dans ces cellules ne se divisant pas. Dans les lignées monocytes-macrophages, des facteurs de restriction comme SAMHD1, qui réduit le pool de dNTPs, MX2, qui inhibe l'infection virale en empêchant l'accumulation nucléaire et l'intégration du DNA proviral et APOBEC3G, sont retrouvés (Goujon et al., 2013; Lahouassa et al., 2012; Pion et al., 2006).

Bien que les macrophages soient incapables de se diviser, le VIH-1 conserve sa capacité à infecter ces cellules en raison de la capacité du PIC à pénétrer dans le noyau à travers une enveloppe nucléaire intacte. Pour expliquer ce phénomène, il a été proposé que le PIC pénètre dans le noyau par un mécanisme de transport actif et par intervention de Vpr (Connor et al., 1995).

En plus des restrictions aux étapes précoces post-entrées du cycle de réplication, une limitation de l'étape de transcription contribue, également, à la résistance des monocytes au VIH-1. Dans les monocytes, le niveau de CycT1, requis à la transactivation par Tat, est inférieur au seuil de détection, cela est dû à sa dégradation par la voie du protéasome. Le défaut d'expression de CycT1 a, également, été lié à un blocage de la traduction par le microRNA miR-198. L'augmentation de la permissivité à l'infection par le VIH-1, pendant la différenciation des monocytes en macrophages, a été associée à une augmentation de l'expression de la CycT1. De plus, l'infection par le VIH-1 contribue à augmenter l'expression de la CycT1. Enfin, pour des raisons qui ne sont toujours pas claires, l'assemblage viral dans les macrophages se produit dans des compartiments intracellulaires à la membrane de vésicules cytoplasmiques (pour revue (Bergamaschi and Pancino, 2010)).

b- Infection des monocytes macrophages in vivo et son impact sur l'immunité

En dépit de la résistance à l'infection *in vitro*, les monocytes de personnes infectées par le VIH-1 contiennent le DNA viral intégré et non intégré à 2 LTR. Des virus répliatifs peuvent être réactivés à partir des monocytes circulants de patients présentant une charge virale indétectable par arrêt des traitements, ce qui indique le rôle important de ces cellules dans la formation du réservoir viral.

L'infection des monocytes et macrophages entraîne un dérèglement du système immunitaire. Il a été montré que la protéine recombinante exogène de Tat augmente la survie des monocytes par l'accroissement de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Tat exogène régule,

également, la production d'IL-10, qui a été corrélée à des niveaux accrus de protéines solubles MD-2 (Myeloid Differentiation-2) et CD14 dont l'élévation est associée à une réponse altérée aux LPS.

Nef inhibe par la voie JNK la transcription d'IL-12p40, une sous-unité inductible de l'IL-12, biologiquement active et induite par le LPS, qui joue un rôle essentiel dans le développement de l'immunité cellulaire.

La fonction immunologique défectueuse des macrophages contribue, considérablement, à la pathogénèse de l'infection par le VIH-1. Le déficit en phagocytose des pathogènes par les monocytes et les macrophages, de même que la sécrétion de cytokines, conduit à un état d'inflammation chronique (pour revue (Coleman and Wu, 2009; Kedzierska et al., 2003)).

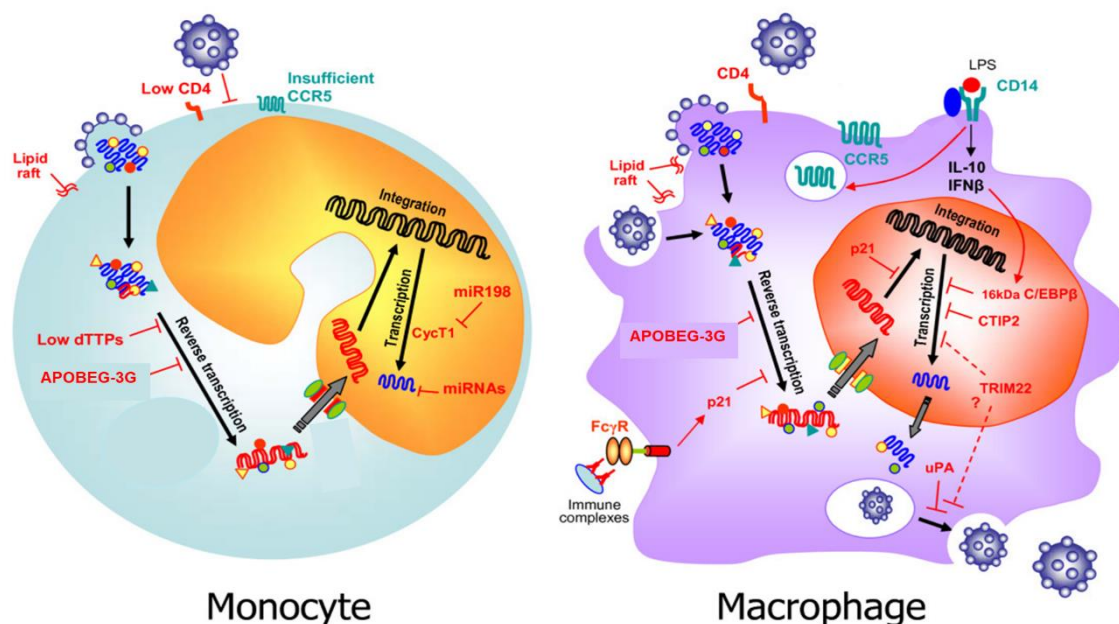


Figure 25 : Représentation schématique de l'infection des monocytes et des macrophages. A gauche, les faibles niveaux de CD4 et CCR5 limitent l'entrée virale dans les monocytes. Les faibles quantités de dTTP réduisent l'efficacité de la RT. APOBEC3G interfère aussi avec la RT du VIH-1 dans les monocytes. Les microRNA cellulaires ont été proposés pour cibler le 3' UTR des transcrits viraux. MiR-198 peut réprimer l'expression de la CycT1. A droite dans les macrophages, le LPS cible les premières phases du cycle du virus à travers la régulation négative de l'expression de CCR5 et la transcription à partir du LTR. Il induit l'expression d'un isoforme inactif du facteur de transcription C/EBPβ, grâce à l'IL-10 (Bergamaschi and Pancino, 2010).

4.5- Les cellules NK

Les cellules NK (Natural Killer) sont les effecteurs antiviraux critiques du système immunitaire inné. Elles sont capables de reconnaître des signaux de stress, de transformation ou d'infection avec une fonction effectrice immédiate. Les cellules NK peuvent médier la cytolysse des cellules infectées par le virus grâce à la libération de granules cytoplasmiques contenant de la perforine et des granzymes, qui représentent le mécanisme de destruction dominant des cellules NK. Elles

induisent l'apoptose via Fas ligand (CD95L), la signalisation Trail ou la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ADCC (Scully and Alter, 2016).

Les cellules NK peuvent reconnaître, directement, les cibles infectées par le VIH, et ce, grâce à leurs récepteurs KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors) qui reconnaissent l'expression de ligands de stress. De même, l'infection par le VIH déclenche la régulation positive des ligands de stress pour les récepteurs de cytotoxicité, y compris NKG2D. Cette reconnaissance peut entraîner une dégranulation avec cytolysse des cibles cellulaires (Richard et al., 2010). En outre, la sécrétion de chimiokines telles que le MIP-1 β , peut bloquer de nouveaux cycles d'infection, et l'IFN γ peut activer des programmes antiviraux (Bluman et al., 1996; Fehniger et al., 1998). Les cellules NK peuvent, également, être recrutées de manière indirecte aux cellules infectées par le VIH, grâce au couplage du récepteur CD16 au domaine Fc des anticorps liés aux antigènes viraux. Ce phénomène correspond à l'ADCC.

Cependant, le VIH a développé divers mécanismes pour échapper à la surveillance immunitaire des cellules NK. Les stratégies d'échappement et de modulation de l'activité des cellules NK se répartissent en cinq catégories (pour revue (Funke et al., 2011; Mikulak et al., 2017; Scully and Alter, 2016)) :

- La régulation négative des ligands cellulaires des récepteurs des cellules NK tel que NKG2D par Nef.
- Échappement à l'ADCC par mutation d'épitopes pour ces anticorps, masquage d'épitopes par glycosylation et trimérisation de gp120/gp41 ou perte des protéines d'enveloppe. De plus, le VIH-1 peut induire l'effusion de CD16 à partir d'autres cellules que les NK, et ainsi produire des molécules CD16 solubles, qui entrent en compétition avec le mécanisme d'ADCC classique.
- Perturbation de l'interaction entre les NK et les DC. La maturation des DC est contrôlée par une destruction des DC immatures par le récepteur NKp30 des cellules NK. Le VIH-1 diminue l'expression de ces récepteurs conduisant à une perte de clairance et à une accumulation de DC immatures.
- Les NK peuvent produire la mort des CD4⁺ non infectées. Un motif dénommé 3S, présent dans la gp41, devient accessible à la suite de l'interaction des glycoprotéines virales avec leur récepteur à la surface des lymphocytes T CD4⁺. Ce motif 3S interagit avec le récepteur du complément gC1qR, et conduit par une cascade de signalisation à l'expression du ligand de NKp44 à la surface des lymphocytes T CD4⁺, non infectées, qui sont détruits par une action cytotoxique des NK.

- L'infection directe des cellules NK par le VIH-1. Initialement, il a été rapporté que les cellules NK du sang périphérique des individus sains ou non perdent l'expression du récepteur CD4. Cependant, une sous-population de cellules NK infectées de manière productive, exprimant le récepteur CD4 en même temps que les corécepteurs CCR5, a été rapportée.

4.6- Les cellules du système nerveux central

L'évolution de la thérapie antirétrovirale a conduit à un succès extraordinaire dans le traitement des sujets séropositifs, le pronostic a changé d'une condamnation à mort à une maladie chronique stable. Avant l'introduction des antirétroviraux, le système nerveux central des patients présentait une « encéphalite subaiguë », et 20-30% des sujets non traités développaient une démence associée au VIH (HAD). Avec des combinaisons appropriées d'HAART, l'incidence de HAD est devenue rare, mais des formes moins sévères sont encore très répandues et affectent de manière significative la qualité de vie des patients. Des symptômes neurologiques aigus peuvent émerger en cas de réplication virale dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Calcagno et al., 2017).

La réplication du VIH-1 dans le SNC est, généralement, limitée par la disponibilité des cellules cibles. Bien que le SNC soit en grande partie dépourvu de lymphocytes T CD4+, les macrophages et les microglies sont abondants dans l'ensemble du SNC. Ces cellules expriment des densités trop faibles de CD4 pour faciliter l'entrée et permettre la réplication du VIH-1. L'examen des populations virales du SNC révèle, qu'au stade avancé de la maladie, le SNC de certains individus contient des variants qui ont évolué et acquis la capacité de pénétrer dans des cellules exprimant de faibles taux de CD4. Ces virus, dits macrophages-tropiques sont capables de se répliquer dans le SNC, et leur présence est associée à une déficience neurocognitive sévère. Cependant, il est important de mentionner que ces variants macrophages tropique sont des virus à tropisme CCR5, qui infectent, principalement, les lymphocytes T CD4+, mais peuvent infecter à un très faible niveau les macrophages, dès la primo-infection (Joseph et al., 2015).

a- L'infection virale non traitée dans le SNC

Après l'infection par le VIH, le virus atteint le SNC et peut être détecté, à la fois, dans le LCR et le tissu cérébral, dès le 8^{ème} jour après l'infection. Le VIH-1 est capable d'envahir le cerveau, en traversant la barrière hémato-encéphalique. Plusieurs voies ont été proposées (pour revue (Kramer-Hämmerle et al., 2005; Toborek et al., 2005), (figure 26).

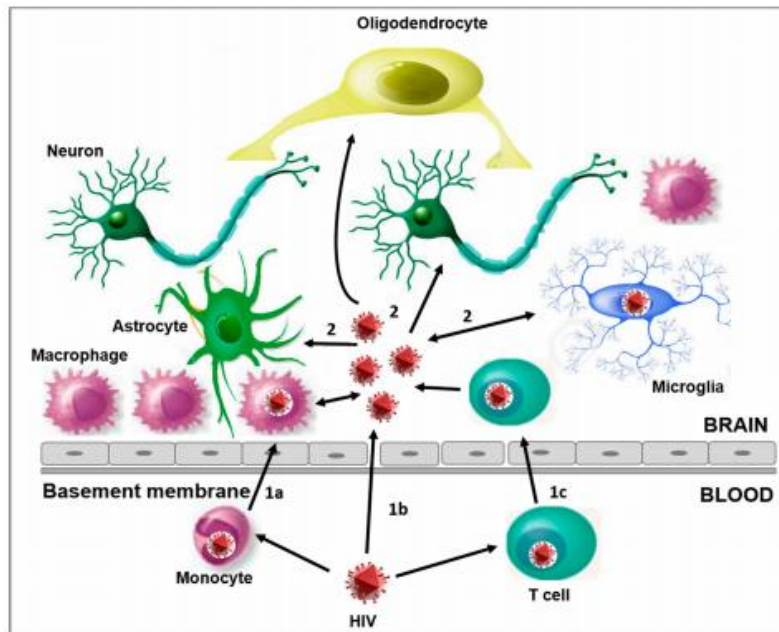


Figure 26 : Les principales caractéristiques de l'infection du SNC par le VIH-1. (1) Les différentes voies d'entrées du VIH-1 dans le SNC se font : (1a) à travers les monocytes infectés par le VIH-1, qui traversent la barrière hémato-encéphalique et se différencient en macrophages périvasculaires, (1b) par le passage du virus libre dans le cerveau, qui est rendu possible, en cas de perméabilité accrue due à des dysfonctionnements et/ou à une altération du tissu, (1c) la migration dans le cerveau des cellules T CD4+ infectées par le VIH-1. (2) Les cellules résidentes du SNC, sensibles à l'infection par le VIH-1 sont, principalement, les microglies et les astrocytes. Les neurones et les oligodendrocytes sont, souvent, considérées comme résistantes. L'activation de ces cellules joue un rôle clé dans la libération de cytokines pro-inflammatoires, qui peuvent amplifier l'altération et la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et favoriser la neuro-invasion du VIH (Scutari et al., 2017).

- Le transport du VIH-1 dans le cerveau par des leucocytes infectés

Cette hypothèse suggère que le VIH-1 accède au cerveau, grâce aux cellules immunitaires infectées tels que les monocytes et les lymphocytes T, qui ont la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique. Ces processus sont médiés par des molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) ou VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) situées, à la fois, sur les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau et les leucocytes.

- Passage de virus libre dans le cerveau

Les particules virales pourraient migrer entre les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau ou y être, alternativement, prises dans des vacuoles pour être libérées du côté du cerveau par le mécanisme de transcytose. Il est, également, décrit que le virus peut être pris en charge par ces cellules suivant un mécanisme d'endocytose absorptive, induit par la gp120. D'autres molécules de surface des cellules endothéliales microvasculaires ont été impliquées dans la fixation et l'entrée du VIH-1, comme DC-SIGN. Cependant, la majorité des virus pris en charge par ces cellules sont détruits par les lysosomes et, seulement, 1% arrive au cerveau (Hong and Banks, 2015).

- Transmission du virus par les cellules endothéliales infectées

Une troisième voie possible, mais controversée, serait l'entrée du VIH-1 dans le SNC, à la suite de la libération du virus par les cellules endothéliales infectées de manière productive. Il est à préciser que cette voie est, principalement, mise en avant par des études *in vitro*, qui supportent l'idée selon laquelle la présence d'un environnement riche en cytokines inflammatoires favoriserait l'infection des cellules endothéliales. Cependant, les études *in vivo* n'ont, à ce jour, pas réussi à montrer la présence d'une infection productive des cellules endothéliales (Mazzuca et al., 2016).

b- L'infection des cellules du système nerveux central

L'invasion du cerveau par le VIH-1 survient au début de l'infection et avant le stade sida. Dans le cerveau, les cibles cellulaires potentielles à l'infection comprennent les macrophages/microglies et les astrocytes. Les neurones et les oligodendrocytes sont, généralement, considérées comme résistantes à l'infection par le VIH-1 (Churchill et al., 2015), (figure 27).

b.1- Les microglies

Les microglies sont des macrophages résidents du SNC, elles représentent 5 à 20% des cellules cérébrales adultes. Les microglies proviennent de précurseurs myéloïdes, qui colonisent le SNC pendant le développement embryonnaire. Les microglies partagent de nombreuses fonctions avec les macrophages tels que la phagocytose, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la présentation d'antigène. Elles ont, également, des rôles de protection qui favorisent le bon fonctionnement et le développement du cerveau (Garden, 2002; Kabba et al., 2018).

Les microglies sont les principales cellules productrices de VIH-1 dans le cerveau. Le VIH-1 peut pénétrer dans la cellule microgliale via le récepteur CD4 et les corécepteurs tels que CCR3, CCR5 et CXCR4. Le paradoxe, expliquant le nombre limité de microglies infectées par rapport aux anomalies diffuses du SNC dans la HAD, a été associé à la libération, par les microglies, de facteurs contribuant à la perte neuronale. Le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-8, le glutamate, l'acide quinolinique, le facteur d'activation des plaquettes, les eicosanoïdes et le NO, sont les principales neurotoxines secrétées par les microglies infectées. En outre, les protéines d'enveloppes du VIH-1 gp120/gp41 et Tat ont été identifiées comme des neurotoxines potentielles. La libération de ces facteurs crée des dommages aux cellules environnantes par activation excessive des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) du glutamate (Chen et al., 2017b; Rock et al., 2004).

La faible biodisponibilité des traitements actuels dans le tissu cérébral et de la présence de DNA viral dans les microglies de patients présentant une charge virale indétectable ou des troubles

neurocognitifs prouve que le SNC agit comme un réservoir potentiel du VIH-1. La présence d'un réservoir de VIH-1 dans le SNC a été renforcée par la détection de DNA viral SIV stable chez des macaques infectés, qui présentaient une charge virale plasmatique indétectable (Clements et al., 2011). Les mécanismes d'établissement et de persistance de la latence dans ces cellules seront détaillés dans la partie latence virale.

b.2- Les astrocytes

Les astrocytes sont dérivés des cellules neuroectodermiques. Ce sont des composants importants de la barrière hémato-encéphalique, qui soutiennent les fonctions, le métabolisme des neurones et l'homéostasie ionique du SNC. Les astrocytes contrôlent l'état des synapses neuronales par l'absorption de neurotransmetteurs et la réparation tissulaire. Bien que ces cellules n'expriment pas de CD4, plusieurs groupes de chercheurs ont identifié la présence de DNA viral dans les astrocytes, ce qui a mis en évidence l'infection de ces cellules (Churchill et al., 2015). Plusieurs mécanismes ont été impliqués dans l'entrée du VIH dans les astrocytes tels que le contact cellulaire, le récepteur D6 des chimiokines, le récepteur au mannose auquel se lie la gp120, DC-SIGN et CCR5. Il a été montré que la fréquence des astrocytes infectés par le VIH était en corrélation avec la gravité des changements neuropathologiques et la proximité des vaisseaux sanguins du cerveau et des macrophages périvasculaires. Cependant, la génération d'une infection productive dans les astrocytes est une question controversée. La plupart des études, *in vivo* et *in vitro*, démontrent que seules les protéines virales précoces peuvent être détectées de manière fiable. Cela indique que les astrocytes pourraient avoir des mécanismes de restriction intrinsèques qui conduisent à une infection non productive (Li et al., 2016a). Plusieurs effets du VIH sur les astrocytes sont rapportés tels que l'astrocytose induite par Tat, qui est caractérisée par une augmentation anormale de l'activité, de la taille et du nombre de ces cellules. Les astrocytes activés libèrent des facteurs neurotoxiques, comme le TNF- α , l'IL-1, MCP-1, l'IP-10 et l'oxyde nitrique NO (Nitric oxide) (Yadav and Collman, 2009). L'élimination rapide du glutamate de l'espace extracellulaire est nécessaire pour la survie et la fonction normale des neurones. L'exposition des astrocytes au VIH-1 et à la gp120 inhibe son absorption (Wang et al., 2003). Tat peut augmenter la concentration intracellulaire du Ca²⁺ dans les astrocytes, avec pour conséquence, une activation excessive des récepteurs au glutamate, une perméabilité excessive de la barrière hémato-encéphalique et une excitotoxicité (Köller et al., 2001; Ton and Xiong, 2013).

b.3- Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes produisent la myéline qui enveloppe les axones neuronaux. C'est une gaine isolante essentielle pour la conduction de l'influx nerveux le long des axones. La

myélinisation axonale est, fortement, régulée par les signaux neuronaux et astrocytaires. Les dommages des oligodendrocytes peuvent provoquer une démyélinisation axonale et des lésions neuronales, entraînant des troubles neurologiques. L'infection des oligodendrocytes par le VIH a, longtemps, été un sujet de controverse. Les premières publications ont rapporté que le VIH-1 ne peut pas être détecté dans les oligodendrocytes. Cependant, d'autres résultats ont démontré, par la détection de p24 et par PCR dirigée contre *gag*, que les oligodendrocytes humains, purifiés à partir de résections du lobe temporal du cerveau, étaient infectés par le VIH-1 (Albright et al., 1996; Trillo-Pazos et al., 2003). Les oligodendrocytes sont CD4 et CCR5 négatifs, mais expriment CXCR4, qui servirait à l'ancrage du VIH-1 dont l'infection est non productive. Les effets pathogènes sont indirectement induits par la libération de Tat et gp120 par les microglies, et ont pour effet l'apoptose des oligodendrocytes et une démyélinisation par augmentation du calcium intracellulaire. La sécrétion de cytokines inflammatoires tels que le TNF- α par les microglies et les astrocytes contribue à l'apoptose des oligodendrocytes (Liu et al., 2016).

b.4- Les neurones

Les neurones n'expriment pas de récepteur CD4, et il est, le plus souvent, admis que leur infection n'a pas lieu. Sachant qu'il a été rapportée par quelques études, la détection de p24 et de *gag* dans les neurones (Trillo-Pazos et al., 2003), et que de nombreux autres rapports n'ont pas permis d'identifier *in vivo*, le VIH-1 dans les neurones, l'infection directe de ces cellules reste encore controversée. De même, si cette infection neuronale existe, elle n'est pas responsable de la neurotoxicité observée dans le cerveau des patients. Les mécanismes impliqués dans la dégénérescence neuronale sont d'origine indirecte. Les effets neurotoxiques de la gp120 sont médiés, indirectement, par ses actions sur les microglies et les astrocytes. La gp120 augmente la libération d'acide arachidonique par les microglies et diminue la capacité de recapture du glutamate par les astrocytes, avec, pour résultat net, une augmentation de la neurotoxicité (Kramer-Hämmerle et al., 2005). La gp41 provoque des élévations de NO dans des cultures mixtes neuronales-gliales conduisant à une neurotoxicité. La gp41 stimule, également, la libération de glutamate à partir d'astrocytes, et pourrait contribuer à l'excitotoxicité des neurones (Adamson et al., 1999). Tat induit une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire dans les neurones, dont l'absorption mitochondriale conduit à l'activation des caspases et à l'apoptose (Louboutin and Strayer, 2014).

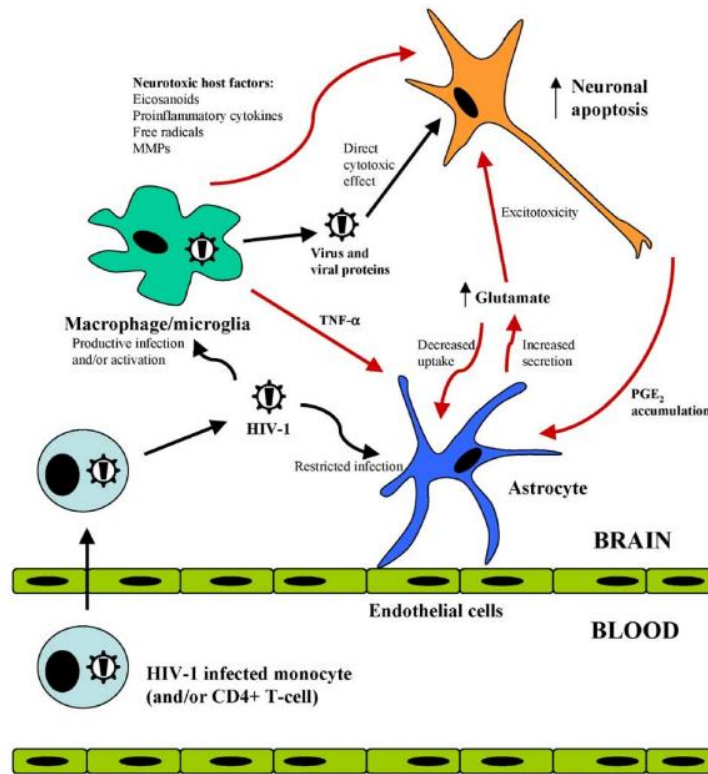


Figure 27 : Les principaux effets du VIH-1 sur les cellules du SNC. Les effets du virus sur le SNC sont multiples et résultent de la production de facteurs neurotoxiques à partir des microglies infectées et/ou activées par le VIH-1. La perturbation de l'homéostasie du glutamate entraîne la mort des cellules neuronales par une voie excitotoxique impliquant : une hyperstimulation du récepteur NMDA, la sécrétion de prostaglandine PGE₂ et de TNF- α (Jones and Power, 2006).

5- Les traitements

L'avancée la plus significative dans la prise en charge médicale des patients VIH-1 a été la mise en place de traitements antiviraux, qui a permis de supprimer la réplication du virus à des niveaux indétectables. Les traitements antiviraux actuels peuvent réduire la morbidité associée au VIH, prévenir la transmission et prolonger la survie avec pour résultat une reconstitution significative du système immunitaire mesurée par une augmentation des lymphocytes T CD4+ circulants. Ces médicaments sont répartis en 5 classes distinctes : les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTIs), les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTIs), les inhibiteurs de l'intégrase (INIs), les inhibiteurs de la protéase (PIs) et les inhibiteurs d'entrée (EIs). La HAART, requise pour une suppression virologique durable, contient trois médicaments actifs provenant de deux ou plusieurs classes. La thérapie est initiée indépendamment du nombre de cellules CD4, immédiatement après le diagnostic d'un patient. Elle comprend, généralement, deux NRTIs combinés à un troisième agent tel qu'un inhibiteur d'intégrase, un NNRTI ou un PI. Toutefois, ces traitements antirétroviraux seuls ne sont pas curatifs. Ils ne peuvent pas éliminer l'infection par le VIH-1, car la virémie rebondit dès l'arrêt

de ces traitements. Une prise à vie est par conséquent, nécessaire. La principale barrière à la guérison est la formation de réservoirs stables de VIH-1 latents chez les patients traités à long terme et qui présentent une virémie indétectable. Le développement de nouveaux traitements est, donc, primordial.

a- Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse (NRTIs)

Les NRTIs constituent la première classe de médicaments à être approuvés par la FDA (Food and Drug Administration), en 1988. Les NRTIs sont administrés sous forme de prodrogues, nécessitant l'entrée cellulaire et la phosphorylation par des kinases, avant d'obtenir l'effet antiviral. Les NRTIs sont des analogues des désoxynucléotides naturels, requis à la transcriptase inverse pour la synthèse de DNA viral. Ils entrent en compétition avec les désoxynucléotides naturels incorporés et aboutissent à une terminaison précoce de la chaîne de DNA virale naissante (Vivet-Boudou et al., 2006).

b- Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTIs)

Contrairement aux NRTIs, les NNRTIs ont un mode d'action complètement différent. Les NNRTIs ne sont pas incorporés dans le DNA viral et ne se lient pas au site actif de la DNA polymérase, mais se lient à une zone moins conservée, près du site actif dans le sous-domaine p66. La liaison des NNRTIs entraîne un changement conformationnel de la transcriptase inverse, qui déforme le positionnement des résidus, qui se lient au DNA, réduisant de ce fait l'activité de la polymérase. Contrairement aux NRTIs, ces inhibiteurs n'inhibent pas la RT d'autres lentivirus tels que le VIH-2 et le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) (Usach et al., 2013).

c- Les inhibiteurs de l'intégrase (INIs)

Les inhibiteurs actuels, approuvés par la FDA, sont le raltégravir, elvitegravir et le dolutégravir. Ils interagissent avec le site actif de l'intégrase du VIH-1 et entrent en compétition avec le DNA viral, afin de bloquer le transfert des brins nécessaires à l'intégration. Récemment, la découverte d'un nouvel INI ALLINIs (Allosteric INIs), altérant la réplication du VIH-1, est, actuellement, en essais cliniques. ALLINIs présente un mécanisme d'action multimodal, en induisant une multimérisation aberrante de l'IN pendant la morphogénèse du virion et interfère sur l'interaction de l'IN avec son cofacteur cellulaire LEDGF/p75, lors des premières étapes de l'infection par le VIH-1 (Patel et al., 2016).

d- Les inhibiteurs de la protéase (PIs)

Les inhibiteurs de protéase (PIs) ont été conçus pour mimer les substrats naturels de la PR virale. Les PIs se lient, spécifiquement, au site actif de l'enzyme, empêchant ainsi la protéase du VIH-1 de cliver les deux protéines précurseur Gag et GagPol, ce qui entraîne la formation

de particules virales, immatures, non infectieuses. Les PIs sont les composants les plus importants de la HAART, car ils présentent un niveau de résistance inférieur aux traitements à base NNRTIs (Ghosh et al., 2016).

e- Les inhibiteurs d'entrée (EIs)

- Les inhibiteurs de fusion

Ces molécules empêchent la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Ils ont été conçus suite à la découverte de deux domaines homologues dans la protéine gp41, dont l'interaction favorise la fusion. Par exemple, l'Enfuvirtide est un peptide synthétique qui mime la séquence HR2 (Heptad Repeat domains 2) de la gp41. Il se lie au complexe trimétrique HR-1 de la gp41, empêche l'association de HR-1 avec HR-2, inhibant ainsi la fusion et bloquant l'entrée du virus. Cependant, ce composé ne peut être administré que par injection, ce qui constitue le point faible de ce traitement (Eggink et al., 2010).

- Les antagonistes du corécepteur CCR5

Les antagonistes CCR5 se lient au récepteur CCR5 et provoquent un changement conformationnel, de sorte que la boucle V3 de la gp120 du virus devienne incapable de reconnaître et de lier son corécepteur. Etant donné que le VIH-1 utilise d'autres corécepteurs pour l'entrée, une détermination du tropisme viral est effectuée, afin de déterminer si le médicament sera efficace chez un patient particulier (Gilliam et al., 2011).

6- Situation actuelle des traitements du VIH-1

Des stratégies efficaces et durables de prévention du VIH-1 sont nécessaires pour réduire le risque de transmission virale des personnes infectées à leurs partenaires sexuels. Plusieurs travaux ont mis en évidence le fort impact de la HAART sur la transmission secondaire du VIH. Une faible charge virale plasmatique (< 400 copies/ml) est associée à une diminution de la concentration de virus dans les sécrétions génitales et un faible risque de transmission du VIH (Cihlar and Fordyce, 2016). Une étude récente HPTN 052, impliquant des couples sérodiscordants, a suggéré qu'une réussite du traitement antirétroviral chez les personnes séropositives réduit le risque de transmission sexuelle du virus (Cohen et al., 2016).

De plus, la nouvelle stratégie, nommée PrEP, a été développée. Elle consiste à utiliser un ou plusieurs médicaments antirétroviraux, afin de prévenir la transmission du VIH-1 aux personnes sans antécédent d'exposition à l'agent pathogène, mais à risque très élevé de d'acquisition du VIH. Truvada est le premier et le seul médicament approuvé pour la PrEP. Truvada est une association de deux médicaments, l'emtricitabine et le fumarate de ténofovir disoproxil, deux inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH-1. L'étude de

taux de nouvelles infections, pendant l'administration de la PrEP, a révélé que, malgré le risque élevé de transmission sexuelle et la diminution de l'utilisation du préservatif, aucune nouvelle infection à VIH n'a été signalée dans ce groupe (Volk et al., 2015).

7- Limites et perspectives de la thérapie anti-VIH-1

a- Les limites

Au cours des 25 dernières années, les chercheurs se sont, principalement, intéressés au développement de traitements supprimant la réplication du VIH-1. La thérapie antivirale, actuellement utilisée, a ses limites. En plus de devoir être pris tout au long de la vie des patients, ces médicaments peuvent provoquer un effet toxique cumulatif et causer l'émergence de nouvelles formes mutantes du virus. En outre, ces antirétroviraux ne sont pas curatifs. Ils bloquent le VIH-1, uniquement dans les cellules à réplication virale active, et restent sans effets sur les virus latents, qui s'intègrent dans le génome des cellules et restent invisibles au système immunitaire. La formation de ces réservoirs de virus latents constitue un obstacle majeur à son éradication. La définition de ces réservoirs viraux, les facteurs impliqués dans leur formation ainsi que les stratégies thérapeutiques développées pour la guérison, seront abordés dans le chapitre suivant.

b- Les perspectives

b.1- Inhibition de l'entrée et de l'assemblage

Plusieurs nouveaux traitements antirétroviraux, avec de meilleurs profils de résistances aux mutations virales et moins d'effets secondaires, sont, actuellement, en phase avancées de développement. Un nouvel inhibiteur d'entrée, qui empêche l'infection des cellules CD4 par liaison à la gp120, s'opposant au changement conformationnel nécessaire à la liaison au corécepteur, est, actuellement, en phase 3 d'essai clinique (Cihlar and Fordyce, 2016).

De nombreux inhibiteurs, bloquant les interactions entre les sous-unités de capsides, afin d'interrompre l'assemblage des particules, ont été identifiés. Cependant, ces inhibiteurs n'ont, à ce jour, pas encore été exploités avec succès dans des traitements antiviraux, cliniquement approuvés (Zhang et al., 2016a).

b.2- Inhibition de la transcription des provirus intégrés

L'une des cibles thérapeutiques potentielles est la protéine Tat et le complexe Tat/TAR/P-TEFb. Actuellement, des inhibiteurs de faible poids moléculaire, affectant la protéine Tat ou la TAR, sont en développement. Les quinolones sont des inhibiteurs efficaces de la transcription dépendante de Tat. Par exemple, la 6-aminoquinolone WM5 inhibe l'interaction entre Tat et TAR, par liaison spécifique à TAR (Tabarrini et al., 2004). Un inhibiteur de Tat le triptolide a

été démontré pour favoriser la dégradation rapide de Tat dans les cellules, inhibant ainsi la transcription (Wan and Chen, 2014).

b.3- Le génome editing

Les chercheurs ont employé différentes stratégies d'édition du gène. La nucléase ZFN (Zinc Finger Nuclease) a été utilisée dans des essais expérimentaux, pour cibler le CCR5 dans les cellules T CD4+. Ce procédé peut retarder la progression de la maladie, mais ne permet pas la guérison (Tebas et al., 2014). La technique d'édition du génome CRISPR/Cas9 peut cibler et retirer des cellules T CD4+ humaines infectées de manière latente, la totalité du génome du VIH-1 intégré de son extrémité 5' à 3' du LTR. CRISPR/Cas9, a diminué la réplication du VIH-1 dans des cultures cellulaires T CD4+ primaires infectées. Un séquençage génomique complet des cellules, dont le virus a été éradiqué, n'a démontré aucun effet compromettant du système CRISPR/Cas9 sur l'intégrité du génome de l'hôte. Ainsi, l'édition de gènes, utilisant CRISPR/Cas9, peut, potentiellement, constituer une méthode novatrice et efficace pour guérir le SIDA (Kaminski et al., 2016).

Des cas d'échappement du VIH-1 à cette inhibition de son expression ont été rapportés par l'acquisition de mutations dans la séquence cible du gRNA (guide RNA), qui fournissent une résistance contre l'attaque de la Cas9 (Wang et al., 2016a). Peu de temps après, cette même équipe a démontré que la combinaison de deux gRNA antiviraux retarde l'échappement viral, et bloque, durablement, la réplication virale (Wang et al., 2016b).

b.4- Les anticorps neutralisants

La sécurité, la pharmacocinétique et l'activité antivirale d'un certain nombre d'anticorps neutralisants ont été démontrés dans des essais cliniques.

Certaines études se sont basées sur l'utilisation d'anticorps neutralisants ciblant soit un site de liaison au CD4 (3BNC117 et VRC01) cloné à partir de patients contrôleurs avirémiques, soit différents épitopes de la boucle V3 (10-1074) de l'enveloppe virale. Ces anticorps ont été bien tolérés et ont conduit à une réduction de la charge virale. Cependant, ces études ont, par la suite, montré l'émergence de résistances et/ou de variants préexistants réfractaires à ces traitements (Caskey et al., 2015, 2017; Lynch et al., 2015). D'autres études ont porté sur la capacité de ces anticorps neutralisants à maintenir la suppression virale, après interruption du traitement antirétroviral. L'infusion de 2 à 4 doses d'anticorps 3BNC117 ciblant CD4, chez des patients dont les virus sont sensibles à ce traitement, ont retardé le rebond viral, après interruption de la HAART (Zhang et al., 2016b). Une autre étude réalisée chez des sujets VIH, qui ont remplacé leur traitement antirétroviral par une monothérapie sous-cutanée à base d'anticorps ciblant le

corécepteur CXCR5, a fourni une importante réduction de la charge virale (Cihlar and Fordyce, 2016).

Actuellement, des essais cliniques, basés sur l'utilisation de 2 anticorps neutralisants (3BNC117 et 10-1074 (NCT02825797)), sont en cours d'évaluation chez des patients VIH-1 non traités ou en interruption de HAART (Cohen and Caskey, 2018). De même, des anticorps à demi-vie prolongée sont en cours d'évaluation. Enfin, VRC01 est testé pour l'efficacité de prévention de l'infection à VIH-1 chez des femmes hétérosexuelles en Afrique subsaharienne et chez les hommes et transgenres ayant des rapports sexuels avec des hommes en Amériques et en Suisse (Cohen and Caskey, 2018).

Globalement, ces résultats suggèrent que les anticorps neutralisants peuvent cibler le réservoir de VIH-1 latent, et pourraient contribuer à la prévention ou à la rémission à long terme de l'infection par le VIH-1

La latence virale

Un réservoir se définit par un type cellulaire ou un site anatomique, dans lequel une forme virale à réplication compétente persiste, avec une cinétique plus stable que les virus à réplication active (Eisele and Siliciano, 2012). Bien souvent une confusion existe entre les termes de réservoirs anatomiques et de sanctuaires anatomiques. Les deux font référence aux sites anatomiques, dans lesquels, le virus peut être présent. Le sanctuaire est, généralement, utilisé pour désigner un site dans lequel la pénétration des antirétroviraux est limitée, permettant une réplication persistante (Eisele and Siliciano, 2012). Les virus ont développé différents mécanismes pour échapper au système immunitaire de l'hôte. L'un de ces mécanismes consiste en l'établissement d'une latence dans les cellules infectées. La latence virale est un état d'infection réversible et non productif des cellules, où il existe une forte restriction de l'expression des gènes viraux. Les cellules infectées de façon latente, contiennent une forme stable du génome viral, soit en plasmide circulaire, comme dans le cas de l'herpès virus, soit en provirus linéaire, intégré de manière stable dans le DNA de la cellule hôte. Pour l'herpès virus, la latence fournit un mécanisme de persistance entre les phases de réplication virale active. Pour le VIH-1, la latence n'est pas nécessaire à la persistance, car la réplication virale active se produit tout au long de l'infection chez les patients non traités (Murray et al., 2016). L'échappement aux réponses immunitaires est lié à l'évolution rapide des variants, non reconnus par les CTL ou les anticorps neutralisants. Ainsi, des réservoirs latents s'établissent, rapidement, chez tous les individus infectés par le VIH-1. Comme décrit précédemment, la HAART n'est pas curative, elle permet de réduire la charge virale plasmatique en dessous de la limite de détection. Cependant, la virémie rebondit, rapidement, dès interruption du traitement. Le principal obstacle à la guérison est la formation de réservoirs stables de VIH-1 latents. La rapide mise en place de la HAART limite la taille du réservoir mais ne bloque pas son établissement (Martínez-Bonet et al., 2015a). Une compréhension détaillée des mécanismes moléculaires, à l'origine de la latence du VIH et de l'établissement de ces réservoirs, représente un défi auquel sont confrontés les chercheurs dans les stratégies visant à l'éradication de ce réservoir et à la guérison.

1- Les réservoirs anatomiques

a- *Le tractus gastro-intestinal (GI)*

Le tissu lymphoïde du tube digestif (GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue) est le plus grand du corps humain. Il comprend environ 80% des lymphocytes de l'organisme, et constitue

le principal réservoir pour le virus. Les cellules T CD4⁺ de la Muqueuse du tractus GI sont infectées et massivement déplétées (jusqu'à 60%), dès les premières semaines d'infection. La minorité des cellules T CD4⁺, survivantes, reviennent à un état de quiescence et persistent malgré la HAART (Anton et al., 2003). La distribution du DNA et RNA viral dans le tractus GI diffère avec une plus forte concentration de DNA dans le rectum et de RNA dans l'iléon. Dans le tractus GI, les concentrations de DNA proviral et de RNA viral, non épissé, sont dix fois plus élevés que dans les PBMCs. Une étude sur des patients, ayant initié la HAART au cours de l'infection aiguë, a montré qu'à l'interruption du traitement, il n'y avait pas de lien phylogénétique entre les séquences de RNA viral à l'origine du rebond, et celles du DNA proviral du tractus GI. En outre, les réservoirs cellulaires du VIH-1, résidant dans le GALT, peuvent être différents de ceux qui circulent dans le sang périphérique (Lerner et al., 2011). Il a été montré que, contrairement, au sang où le DNA et RNA viral sont retrouvés dans les cellules T CD4⁺ à mémoire centrale et mémoire transitoire, dans l'intestin, ils se trouvent dans les cellules effectrices mémoires. Ces résultats confirment que l'environnement tissulaire peut avoir des effets sur la taille et la répartition du réservoir pendant la HAART, et que les connaissances fournies par les études sur le sang périphérique ne peuvent pas refléter ce qui se passe dans les tissus (Yukl et al., 2013a). Le VIH a aussi la capacité d'infecter les cellules épithéliales gastriques par un mécanisme indépendant des CD4 et d'induire une inflammation sévère dans le tissu gastrique. D'autres études sont nécessaires pour élucider le rôle des réservoirs cellulaires du VIH-1 dans ce site anatomique (Liu et al., 2013).

b- Le tractus génital

Le risque de transmission sexuelle du VIH-1 est corrélé aux niveaux de RNA viral dans le sang et les sécrétions génitales. Le VIH contamine le tractus et les sécrétions génitales pendant les stades aigus et chroniques de l'infection (Houzet et al., 2014). Une étude, réalisée dans des modèles de macaques, a montré que l'initiation de la HAART, très précocement après l'infection, empêche efficacement la dissémination virale au tractus génital mâle (Moreau et al., 2012). Bien que la HAART réduise la charge virale à des niveaux indétectables, la transmission sexuelle du VIH et sa détection séminale intermittente peuvent se produire avec une fréquence variant de 2 à 48%, selon les caractéristiques de la population observée. Cette appréciation suggère la présence d'un réservoir résiduel dans le tractus génital. La pénétration des traitements dans le tractus génital est limitée, particulièrement dans le testicule, où la barrière sang-testicule limite, également, l'entrée des cellules immunitaires (Svicher et al., 2014).

c- Les nodules lymphatiques

Le corps humain adulte contient entre 500 et 700 nodules lymphatiques à travers lesquels circulent les populations de cellules T CD4+, et où le VIH-1 persistant peut, également, être isolé, faisant de ce tissu lymphoïde un important réservoir chez les patients sous HAART. En outre, les lymphocytes T mémoires helper folliculaires (Tfh) et les DC folliculaires qui résident dans les centres germinatifs, peuvent constituer une source stable de virus à réplication compétente. Les ganglions lymphatiques constituent, également, un défi à l'éradication du VIH-1, car il a été démontré que leur emplacement anatomique contenait des doses plus faibles de médicaments que le sang périphérique (Barton et al., 2016).

d- Le SNC

Le SNC constitue un réservoir persistant pour le VIH, chez les patients sous HAART, car la barrière hémato-encéphalique limite l'accès aux traitements antirétroviraux et aux cellules immunitaires. Les astrocytes et les macrophages infectés constituent les principaux réservoirs du virus dans le cerveau (Barton et al., 2016).

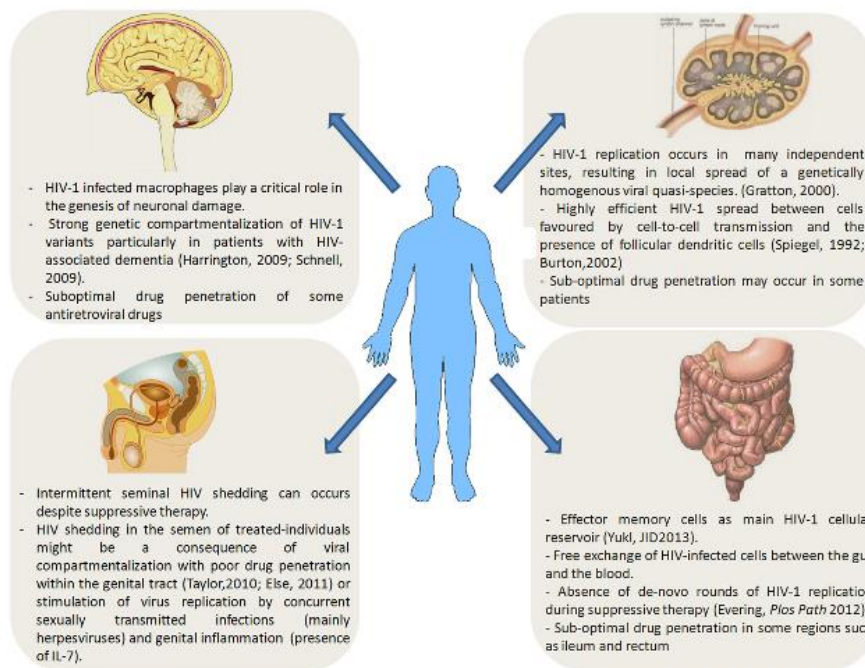


Figure 28 : Représentation des principales caractéristiques des réservoirs de VIH-1 dans les principaux sites anatomiques de l'infection (Svicher et al., 2014).

2- Les réservoirs cellulaires

a- Les cellules T CD4+ mémoires

Les cellules T CD4+ quiescentes sont considérées comme le plus grand réservoir du VIH-1, (figure 29). Les membres de cette population cellulaire hétérogène se distinguent par leur état de différenciation en cellules T naïves et mémoires. Le premier stade de différenciation des

cellules mémoires se fait à partir des cellules T CD4⁺ naïves (TNA), produites dans la moelle osseuse, et qui subissent une sélection dans le thymus. Les TNA sont peu permissives à l'infection VIH-1 comparé aux CD4⁺ mémoires. Les TNA se différencient en cellules effectrices à courte durée de vie, lorsque leur récepteur est stimulé par les cellules présentatrices d'antigènes. Un petit sous-ensemble de ces cellules effectrices se différencie, ensuite, en cellules T mémoires à longue durée de vie, qui portent le VIH-1 latent. Les cellules T mémoires peuvent être divisées en deux principales sous-populations, les lymphocytes T à mémoire centrale (TCM) et les cellules T mémoires effectrices (TEM), en fonction de l'expression des récepteurs de chimiokines impliquées, respectivement, dans le trafic vers des organes lymphoïdes secondaires ou vers des sites périphériques (Barton et al., 2016; Murray et al., 2016).

Les TCM (CD45RA⁻, CCR7⁺, CD27⁺) et un autre sous-groupe de cellules T mémoires, intermédiaires entre les TCM et TEM (CD45RA⁻, CCR7⁻, CD27⁻), il s'agit des cellules T à mémoire transitoire (TTM) (CD45RA⁻, CCR7⁻, CD27⁺), sont identifiés comme les principales cellules infectées, qui persistent chez les patients sous HAART. Ces deux principaux sous-groupes constituent un réservoir plus stable pour le VIH-1 que les TEM, qui ont un indice prolifératif plus élevé, et sont plus sensibles à la mort cellulaire programmée (Chomont et al., 2009). Cependant, il a été démontré que le DNA viral est moins fréquent dans les TTM que dans les TCM, en raison d'un excès de virus défectueux, qui s'est développé à travers la prolifération (Soriano-Sarabia et al., 2014).

Récemment, une autre sous population de cellules T CD4⁺ mémoires, les TSCM (stem cell-like memory T cell) ont été définies pour leur capacité à contribuer à la persistance du VIH-1. Les TSCM sont considérés comme le stade le moins différencié des cellules T mémoire. Elles comprennent 2 à 4% des lymphocytes circulants, ont une longue durée de vie avec la capacité de se différencier en TCM et TEM. Les TSCM sont permissives à l'infection par le VIH-1 et la proportion de DNA viral, associée à ces cellules, est plus élevée que dans les TCM. Bien que les TSCM soient infectée de façon latente, elles ne représentent qu'une petite fraction du réservoir total (Buzon et al., 2014).

En résumé, l'analyse des sous-groupes de cellules T mémoires révèle que le génome du VIH-1 se répartit avec des fréquences plus élevées dans les cellules ayant un plus grand potentiel de survie. Cependant, selon l'introduction de la HAART, il existe, entre les patients, une importante variabilité de distribution des génomes viraux dans ces sous-groupes de cellules T mémoires (Murray et al., 2016). Il existe deux principales théories sur la façon dont la latence s'établit dans les cellules T CD4⁺ quiescentes. La première, est que les cellules T CD4⁺

infectées, latentes, sont issues de la survie d'une cellule T CD4+ activée, infectée, qui revient à l'état de quiescence. L'autre théorie suggère que la latence s'établit à la suite d'une infection directe des lymphocytes T CD4+ au repos, en l'absence de toute activation des lymphocytes T. Dernièrement, l'expression de CD32a a été rapportée comme un marqueur potentiel des cellules T CD4+ abritant un réservoir de VIH-1 à réplication compétente, chez les patients avirémiques sous HAART (Descours et al., 2017). Cependant, cette étude n'a pas défini l'état de quiescence (CD69-, CD25-, HLA-DR-) ou d'activation des cellules T CD4+ et l'enrichissement de CD32a sur les cellules T CD4+ infectées, latentes, n'était pas clair. D'autres travaux ont permis de préciser que CD32a n'est pas un marqueur des cellules T CD4+ quiescente ou infectées latentes. CD32a est, principalement, exprimé sur un sous-ensemble de cellules T CD4+, activées, enrichies en VIH-1 transcriptionnellement actif (Abdel-Mohsen et al., 2018).

Plusieurs facteurs ont été décrits pour contribuer à la persistance des cellules infectées, tels que l'expression de régulateurs négatifs de l'activation des lymphocytes T (PD-1, CTLA-4) (McGary et al., 2017). La demi-vie du réservoir latent a été, initialement, estimée à 44 mois. Sur la base d'une étude numérique, en présence d'un nombre constant de cellules non infectées sous HAART, il faudrait en moyenne 31 ans pour éradiquer ce réservoir (Viswanath, 2016).

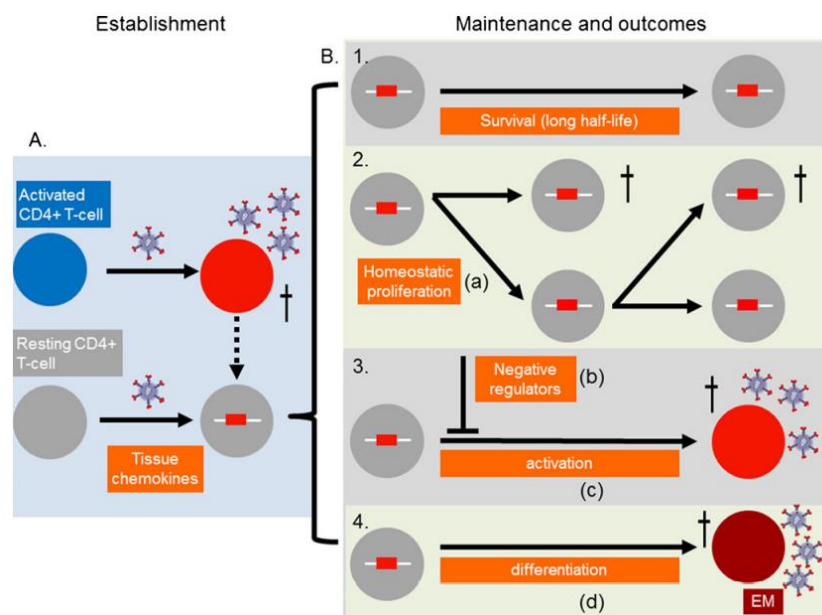


Figure 29 : Etablissement et maintien des cellules T infectées latentes. (A) La latence s'établit de deux façons. Suite à l'infection productive des lymphocytes T CD4+, la plupart meurt, seules certaines survivent et reviennent à un état de quiescence, sous forme de cellules T mémoires infectées latentes. En outre, la latence peut s'établir par infection directe des cellules T CD4+ quiescentes, en présence de chimiokines telles que le ligand de CCR7, le CCL19. (B) Une fois la latence établie dans ces cellules elles peuvent 1) survivre pendant un temps extrêmement long, 2) subir une prolifération homéostatique, en présence de cytokines comme l'IL-7, 3) subir une activation, conduisant à une infection productive, ou 4) subir une différenciation cellulaire pour aboutir à des TEM infectées de manière productive (Smith et al., 2012).

b- Les monocytes et macrophages

Bien que les lymphocytes T CD4+ mémoires soient un réservoir cellulaire à long terme pour le VIH-1, ils ne constituent pas la seule source de rebond de la charge virale à l'arrêt de la thérapie. Comme mentionné précédemment, et en dépit de leur résistance à l'infection, la détection du VIH-1 dans les monocytes-macrophages de patients sous HAART en fait un réservoir potentiel (Araínga et al., 2017; Kumar et al., 2014). Des mécanismes ont été mis en évidence pour confirmer cet état de latence dans les macrophages résidents du SNC. Marban et al., ont identifié la nature de la latence dans ce réservoir cellulaire et ont constaté que la réplication virale était supprimée au niveau transcriptionnel, par recrutement du facteur CTIP2 sur le promoteur viral (Marban et al., 2007).

c- Les cellules dendritiques

Comme expliqué dans la partie cibles cellulaires du virus, les cellules dendritiques sont impliquées dans la propagation du VIH-1, par la capture de celui-ci par le récepteur DC-SIGN ainsi que par la formation de synapses virologiques. Les cellules dendritiques folliculaires (fDC) dans les tissus lymphoïdes sont spécialisées dans le piégeage et la conservation d'antigènes sous forme de complexes immuns à leur surface, y compris les virions du VIH-1, qui peuvent servir de potentiel réservoir viral. Ces fDC peuvent ainsi transférer le virus aux cellules T présentes dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires (Miles and Connick, 2016). En outre, les mDC situées dans les ganglions lymphatiques, peuvent soutenir un très faible niveau de réplication virale et auraient un rôle potentiel dans la latence du VIH-1. Cependant, le mécanisme de persistance viral dans ces cellules n'est pas, encore, clairement compris (Kandathil et al., 2016).

d- Les précurseurs hématopoïétiques

La littérature, concernant l'infection des cellules progénitrices hématopoïétiques (HPC), est controversée. Des études menées sur l'infection des HPC très primitives n'ont pas démontré d'infection de ces cellules. Cependant, plusieurs chercheurs ont montré que les sous-populations HPC CD34+ expriment CD4, CCR5 et/ou CXCR4, rendant ces cellules susceptibles au VIH-1. Le DNA viral a été détecté dans les HPC de patients sous HAART, ce qui pourrait démontrer l'implication de ces progéniteurs dans la persistance du VIH-1. Malgré l'infection limitée des HPC, leur rôle en tant que réservoir viral peut être crucial, en raison de leur potentiel prolifératif et de génération de lignées cellulaires infectées telles que les monocytes qui peuvent propager le virus (McNamara and Collins, 2011).

e- Les astrocytes

Comme décrit dans la partie cibles cellulaires du VIH-1, la détection de DNA proviral et des RNA des produits géniques précoces et non tardifs dans les astrocytes, *in vivo* et *in vitro*, indique que ces cellules sont susceptibles, de manière restreinte, à l'infection VIH. Il a été démontré que, contrairement, à l'infection par un virus libre, le contact cellulaire entre les astrocytes et les lymphocytes T CD4 infectés, conduit à une infection robuste des astrocytes, mais avec conservation de la restriction de l'expression des gènes viraux (Luo and He, 2015). Le virus maintient, ainsi, un niveau extrêmement faible de réplication dans les astrocytes, mais qui peut être renforcé par des signaux inflammatoires, tels que l'IFN- γ (Carroll-Anzinger and Al-Harhi, 2006). En outre, il a été démontré que la bryostatine, décrite pour réactiver l'infection virale latente, induit l'expression du VIH-1 latent dans les astrocytes (Díaz et al., 2015). Une étude récente a montré, *in vitro*, que la réduction de la production virale dans les astrocytes est liée à leur faible capacité proliférative. Cependant, une faible fraction de ces cellules présentait des provirus silencieux non réactivables. Ces résultats sous-entendent que les astrocytes ne constituent pas un réservoir latent (Barat et al., 2018). Enfin, malgré la détection de DNA proviral dans les astrocytes de patients infectés, pour mettre en avant le rôle de ces cellules en tant que réservoir, il serait souhaitable de les étudier chez des patients en interruption de HAART (Smith et al., 2012).

3- La latence pré et post-intégrative

Deux types de latences peuvent être définis suivant l'état d'intégration du VIH : la latence pré-intégrative et post-intégrative. La latence pré-intégrative entraîne un blocage partiel ou complet du cycle de réplication, avant l'intégration du génome viral dans le génome de l'hôte. Cela pourrait résulter d'une transcription inverse, incomplète, ou d'une restriction par des facteurs tels que APOBEC3G (Abbas and Herbein, 2012). Les provirus non intégrés constituent une population hétérogène, qui varie en termes de structure moléculaire, de stabilité, et de profil d'expression. Des inhibiteurs de l'intégrase tels que le Raltegravir mènent à des mutations de l'intégrase, qui altèrent l'intégration du VIH-1 et conduisent à une accumulation de formes de DNA virales circulaires, non intégrées (Bona et al., 2013). Les DNA viraux non intégrés peuvent être retrouvés sous forme linéaire ou circulaire à un ou 2 LTR. Il est décrit que ces formes non intégrées de DNA virale sont enrichies en modifications d'histones marquées par une chromatine transcriptionnellement silencieuse (Kantor et al., 2009). Initialement, il avait été rapporté que seule la transcription de certaines protéines accessoires, telles que Nef, Vpr et Rev, était possible à partir de ces formes non intégrées (Thierry et al., 2017). D'autres travaux

ont, par contre, démontré que la production virale pouvait être détectée à partir du DNA viral non intégré, après la réactivation des cellules T CD4+ quiescentes (Chan et al., 2016). Ces travaux suggèrent que ces formes circulaires à 2 LTR peuvent être considérées comme un réservoir pour la latence pré-intégrative (Chan et al., 2016).

Il est à préciser que ces formes non intégrées ne persistent qu'un seul jour dans le cytoplasme des cellules T CD4+, et jusqu'à un mois dans les macrophages. Elles ne peuvent, donc, pas expliquer la persistance à long terme dans les CD4+ infectées latentes. Il est à ce jour le plus souvent admis que la latence pré-intégrative ne semble pas avoir de signification clinique (Sloan and Wainberg, 2011).

La latence post-intégrative s'établit très tôt, dès les premiers jours de l'infection aiguë. Elle constitue la principale forme de réservoir viral, et se produit après retour des lymphocytes T CD4+ activés, infectés, à un état de quiescence. Dans la latence post-intégrative, le virus est intégré de manière stable dans le génome de l'hôte, sans parvenir à une infection productive. Cet état latent est stable, mais réversible, et n'est pas, uniquement, limité par la durée de vie de la cellule infectée. La latence post-intégrative est un phénomène multifactoriel non encore élucidé complètement, où le DNA proviral intégré est réduit au silence par diverses causes épigénétiques ou non (Kumar et al., 2015).

4- Mécanismes de la latence post-intégrative

4.1- Site et orientation de l'intégration

Comme mentionné précédemment, l'intégration provirale du VIH-1 a lieu dans les introns de gènes, transcriptionnellement actifs, et dans des régions situées à proximité de l'enveloppe nucléaire (Marini et al., 2015; Singh et al., 2015). Une étude récente a démontré que les provirus intégrés de façon proximale aux enhanceurs sont exprimés à un niveau plus élevé que ceux situés dans d'autres régions géniques. Cette même étude a, également, prouvé que les provirus latents sont, généralement, trouvés éloignés des promoteurs et enhanceurs et que la distance de ces éléments régulateurs détermine la réponse à différents agents réactivateurs de latence (Chen et al., 2017a).

Néanmoins, il semble contradictoire que le provirus latent puisse exister dans des régions activement transcrites. Ce phénomène souligne l'importance de l'interférence transcriptionnelle en tant que mécanisme supprimant l'expression du provirus intégré dans ces régions actives, en raison de son orientation ou sa proximité avec un promoteur de gènes plus fort, (figure 30).

Plusieurs mécanismes d'interférence transcriptionnelle sont décrits :

- Le phénomène d'encombrement stérique se produit lorsque le provirus s'intègre dans la même orientation transcriptionnelle que le gène hôte. La transcription du promoteur en amont déplace les facteurs de transcriptions clés du promoteur du VIH-1 et empêche l'assemblage du complexe de pré-initiation au promoteur viral, entravant ainsi la transcription du VIH-1 (Callen et al., 2004).
- La transcription convergente peut conduire au phénomène d'occlusion du promoteur. Elle se produit lorsque le provirus, intégré dans une orientation opposée au gène hôte, conduit à la collision de deux complexes de RNA Pol II pendant l'élongation. Il s'ensuit une terminaison prématurée de la transcription des deux promoteurs.

La transcription convergente peut, également, permettre la production de RNA double brin lors de l'allongement des deux brins de DNA viral. La formation de RNA bicaténaires pourrait, alors, conduire à l'extinction de la transcription ou à la génération de RNA antisens (Ruelas and Greene, 2013).

- La Capture d'enhancers se produit lorsque l'enhancer du LTR 5' est détourné par le promoteur d'un gène cellulaire voisin, et agit sur l'activité transcriptionnelle de celui-ci (Abbas and Herbein, 2012).

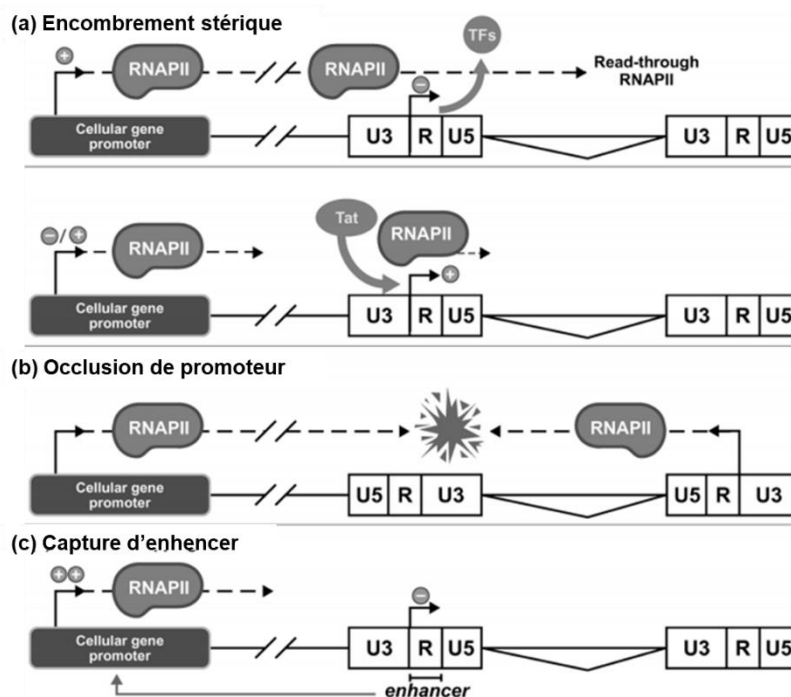


Figure 30 : Figure simplifiée des multiples mécanismes d'interférence transcriptionnelle, impliqués dans la latence post-intégrative du VIH-1 (Colin and Van Lint, 2009b).

4.2- Disponibilité des facteurs cellulaires et viraux de transcription et d'élongation

L'expression du VIH-1 dépend, fortement, de la machinerie transcriptionnelle de l'hôte. L'absence de facteurs activateurs et la présence de facteurs répresseurs influencent fortement la latence virale. Une des caractéristiques des lymphocytes quiescents est la faible disponibilité des facteurs activateurs de la transcription, en raison de leur séquestration cytoplasmique. Ceux-ci incluent les facteurs de transcription NF- κ B et NFAT, et STAT5 qui sont séquestrés dans le cytoplasme en l'absence de signaux d'activation (Hakre et al., 2012). Le site NF- κ B est, ainsi, occupé par un homodimère inhibiteur de NF- κ B p50/p50 qui recrute HDAC1 pour créer un environnement répressif (Jiang and Dandekar, 2015; Williams et al., 2006a).

Dans le cas de STAT5 la phosphorylation d'un résidu tyrosine près de l'extrémité C-terminale entraîne sa translocation nucléaire nécessaire à l'activation transcriptionnelle du VIH-1. L'absence de forme phosphorylée active de STAT5 contribue à la séquestration cytoplasmique de ce facteur et à la répression de la transcription virale dans les lymphocytes T CD4+ quiescents (Bosque et al., 2017; Della Chiara et al., 2011).

L'importance du facteur AP-1 dans la latence est, également, décrite. Il a été révélé que la mutation de 4 nucléotides dans les sites AP-1 du LTR empêche l'établissement de la latence, tandis que l'extension de cette mutation à 7 nucléotides favorise la latence (Duverger et al., 2013).

La réduction de la disponibilité de P-TEFb, due à sa séquestration par le complexe 7SK SnRNP, est renforcée par le facteur CTIP2, ce qui restreint la transcription du VIH dans les cellules microgliales. De la même façon, la protéine HMGA1 (High Mobility Group AT-hook 1), connue pour lier, également, le 7SK RNA, coopère avec CTIP2 dans le recrutement du complexe P-TEFb inactif au promoteur viral (Cherrier et al., 2013; Eilebrecht et al., 2014).

De plus, CTIP2 est décrit comme un puissant inhibiteur de la phase tardive de la transcription médiée par Tat. L'interaction de CTIP2 avec HP1 α est impliquée dans la relocalisation de Tat dans des régions transcriptionnellement inactives de la chromatine (Rohr et al., 2003a). Dans les lymphocytes T CD4+, CTIP2 et le complexe NuRD sont recrutés au promoteur viral et répriment la transcription médiée par Tat (Cismasiu et al., 2008). Toutefois, l'interprétation de ces résultats doit se faire avec prudence, car l'activité de CTIP2 dans les lymphocytes T CD4+ est contrôlée par le niveau d'activation des cellules (Dubuissez et al., 2016).

4.3- Structure de la chromatine et régulation épigénétique de la latence virale post-intégrative

L'organisation de la chromatine et le contrôle épigénétique du promoteur du VIH-1 sont des éléments clés de l'extinction de la transcription virale. Il a été montré que les deux nucléosomes, nuc-0 et nuc-1, sont positionnés précisément dans la région promotrice du VIH-1 dans les lignées cellulaires infectées latentes, et que nuc-1 impose un bloc à l'allongement transcriptionnel. Après l'activation transcriptionnelle, nuc-1 est, spécifiquement, remodelé (Verdin et al., 1993). La condensation de la chromatine est, aussi, essentielle à la régulation de l'expression des gènes, puisqu'elle détermine l'accessibilité du DNA aux facteurs régulateurs de la transcription. L'euchromatine correspond aux régions décondensées du génome activement transcrits. En revanche, l'hétérochromatine réfère à des régions du génome fortement condensées et transcriptionnellement inactives (Kumar et al., 2015).

4.3.1- Structure de la chromatine

Le DNA des eucaryotes est empaqueté dans une structure appelée chromatine. L'unité répétitive structurale et fonctionnelle de la chromatine est le nucléosome dans lequel 146 paires de bases de DNA sont, étroitement, enroulées en 1,65 tours d'hélice. Chaque nucléosome est composé d'octamères de protéines histones, composés, de deux molécules de chacune des quatre histones centrales H2A, H2B, H3 et H4. Chaque nucléosome est stabilisé et relié au suivant par une région de DNA linker, associée à l'histone H1. Les domaines N-terminaux de chaque histone, se projetant à l'extérieur du noyau nucléosomique, sont soumis à de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, la sumoylation et l'ubiquitination, (figure 31). Ces modifications d'histones contribuent à la régulation transcriptionnelle, en définissant un état décondensé de la chromatine : ouvert (euchromatine) ou condensé : fermé (hétérochromatine) (pour revue (Turner and Margolis, 2017)). L'état de condensation de la chromatine peut, aussi, être modulé par méthylation du DNA ou par divers mécanismes qui, peuvent être dépendants de l'ATP. Par exemple, les complexes de remodelage de la chromatine BAF/PBAF, couplent l'hydrolyse de l'ATP à des changements structuraux dans le nucléosome. Ces modifications influencent l'expression génique par deux mécanismes différents : (1) soit en altérant les interactions entre les histones et le DNA, (2) soit en recrutant des enzymes, capables de modifier la structure de la chromatine. Ces modifications fonctionnent séquentiellement ou agissent en combinaison pour former le « code histone ». Elles servent de plateformes de recrutement, extrêmement sélectives, pour des protéines

régulatrices spécifiques, qui pilotent différents processus biologiques (Ruelas and Greene, 2013).

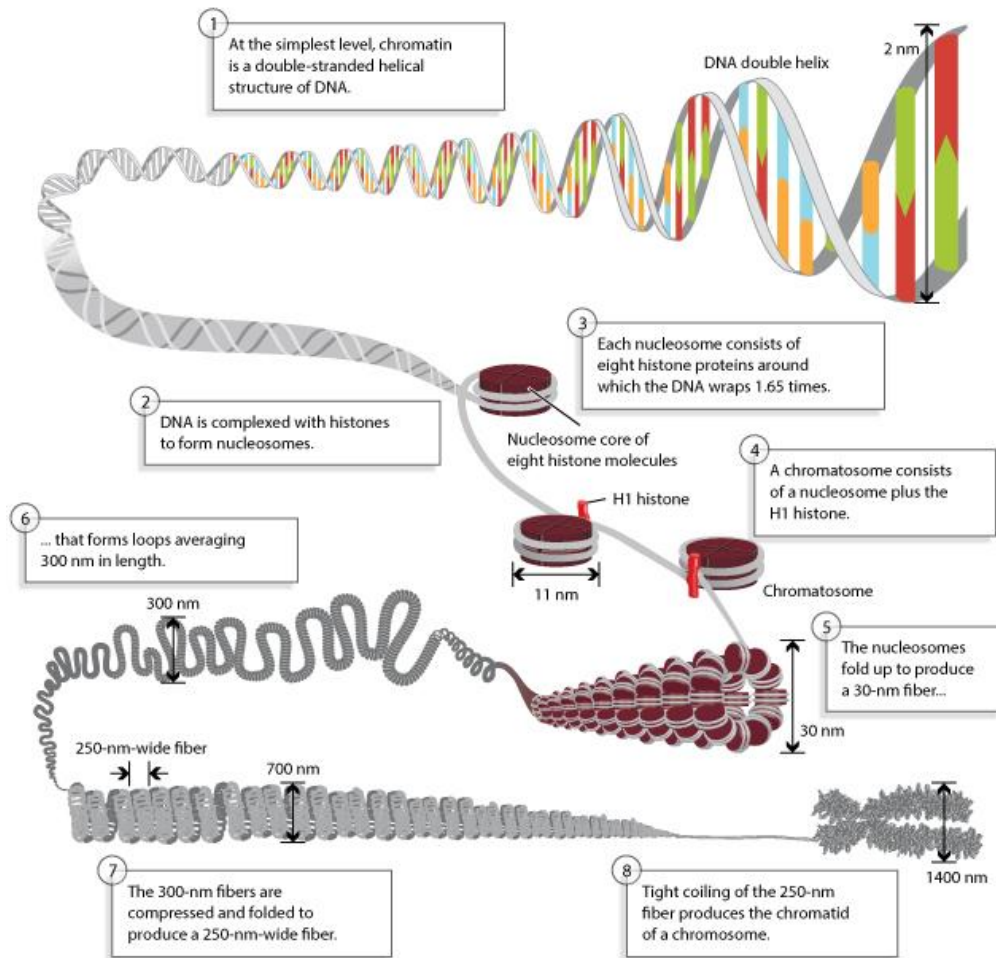


Figure 31 : Représentation des différents niveaux de compaction du DNA (Annunziato, 2008).

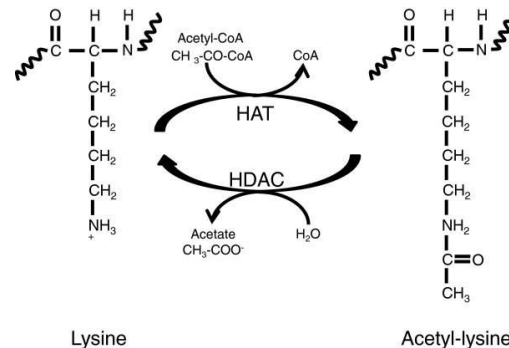
4.3.2- Les modifications post-traductionnelles des histones

Les deux principales modifications les plus étudiées, qui régulent l'expression, sont l'acétylation et la méthylation des histones. Les HAT catalysent le transfert d'un groupe acétyle de l'acétyle coenzyme A sur le groupe N-amino terminal d'un résidu lysine. Ce transfert entraîne la neutralisation des charges positives sur l'histone favorisant la déstabilisation des interactions histone-DNA dans le nucléosome, avec une accessibilité accrue de la chromatine à la machinerie transcriptionnelle. Les histones désacétylases (HDAC) éliminent ces groupes acétylés, entraînant une répression transcriptionnelle. Ces fonctions opposées des HAT et des HDACs permettent la commutation entre les différents états d'acétylation et déterminent l'état d'activation ou de répression des gènes, (figure 32 A). Les histones méthyltransférases (HMT) catalysent le transfert d'un à trois groupes méthyle à partir du cofacteur S-adenosyl-méthionine (SAM) aux résidus lysine et arginine des extrémités N-terminales d'histones menant à la formation de S-adenosylhomocystéine (SAH). Dans ce cas, la méthylation des histones n'a pas

d'effet sur les interactions DNA-histones, mais sert de plateforme de reconnaissance aux facteurs de remodelage de la chromatine. Il est à noter que la méthylation de la lysine peut être liée, à la fois, à l'activation et à la répression transcriptionnelle, selon le site de modification, (figure 32 B). Les études de l'état de méthylation et d'acétylation des histones dans les lymphocytes T CD4⁺ ont identifié un groupe de 17 marques associées à une activation transcriptionnelle plus élevée. Ces 17 marques comprennent H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac, et H4K91ac (Wang et al., 2008).

Cependant, ces marques de méthylation H3K27me2, H3K27me3, H3K9me2, H3K9me3 et H4K20me3 sont associées à une chromatine répressive (Wang et al., 2008).

A



B

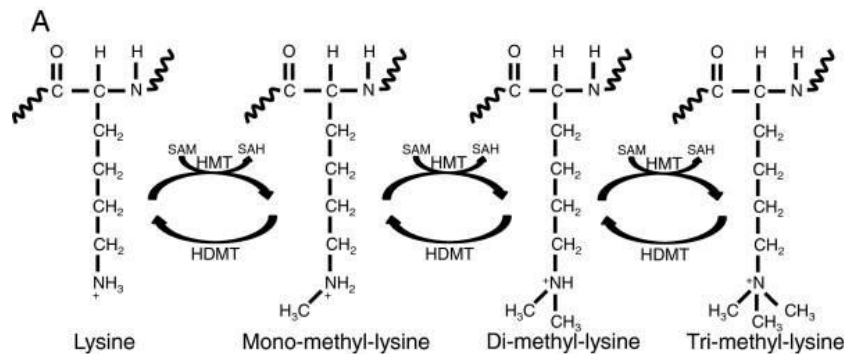


Figure 32 : Réactions d'acétylation (A) et de méthylation (B) des lysines des histones. Les lignes en boucles représentent le reste de la protéine (Gutierrez and Romero-Oliva, 2013).

4.3.2.1- Les marques d'histones associées à une activation transcriptionnelle du VIH-1

a- *L'acétylation des histones H3 et H4 au promoteur viral*

L'un des premiers événements suivant la réactivation virale est le recrutement d'HAT CBP, GCN5 et PCAF au promoteur LTR. Le recrutement des HAT est lié à une augmentations globale de l'acétylation des H3 et H4 aux nucléosomes entourant le LTR, avec augmentation spécifique des marques H3K9ac, H3K14ac, H3K27ac, H4K5ac, H4K8ac et H4K16ac (Lusic et al., 2003; Zhang et al., 2017).

Tout récemment, le rôle de l'acétylation des histones H4 sur l'activité du promoteur LTR a été contesté. Li *et al.*, ont montré par analyse de lymphocytes T CD4+ infectés, que le promoteur LTR latent a une faible teneur en AcH3, mais une teneur très élevée en AcH4. Ce profil d'acétylation inhabituel (AcH4) attire Brd4 pour supprimer l'interaction de P-TEFb et du SEC avec Tat. Ces résultats démontrent que l'histone acétyl transférase KAT5 (Tip60), connue pour acétyler les lysines 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4, contribue à promouvoir la latence du VIH-1 par formation de l'axe KAT5-AcH4-Brd4 (Li et al., 2018).

L'importance de l'acétylation des résidus lysines sur les histones du LTR est marquée par la capacité des inhibiteurs d'HDACs (HDACis) à induire la réactivation dans plusieurs modèles de latence et dans des cultures cellulaires, *ex vivo*, de patients VIH sous HAART (Bouchat et al., 2016). Plusieurs facteurs de transcription sont capables de recruter HDAC1 sur le LTR. Ceux-ci comprennent YY1, LSF (Romerio et al., 1997), AP-4 (He and Margolis, 2002), CTIP2 (Marban et al., 2007), CBF1 (Tyagi and Karn, 2007), l'homodimère p50 de NF-kB (Williams et al., 2006b), c-Myc et Sp1 (Jiang et al., 2007). Le recrutement de HDAC3 sur le promoteur se fait par USF et CBF1, (figure 33), (Malcolm et al., 2007).

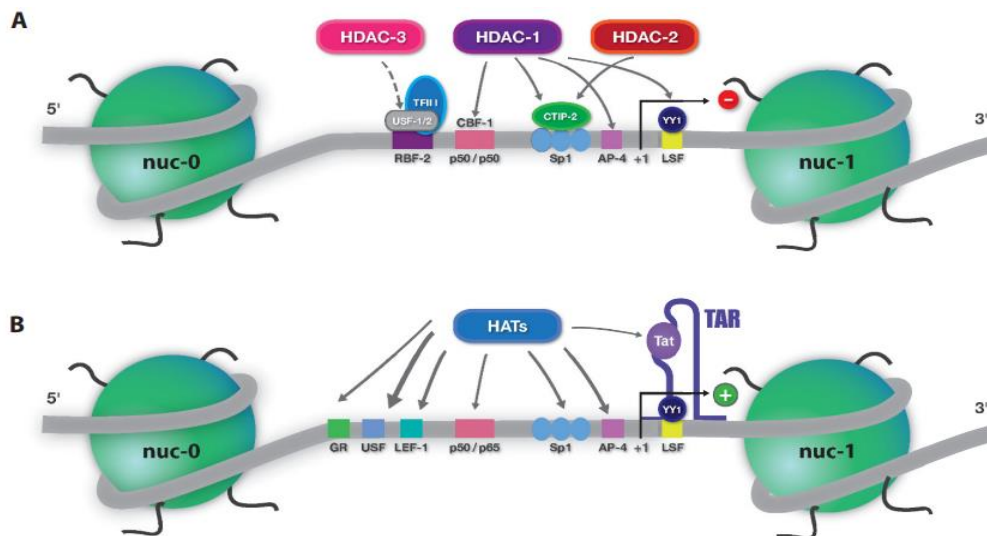


Figure 33 : Recrutement des HDACs et HATs au promoteur viral. (A) Pendant la latence, nuc-1 bloque la transcription, en raison de son hypoacétylation suite au recrutement des HDACs sur plusieurs sites de liaison de facteurs de transcription. (B) le recrutement local des HATs par des facteurs de liaison au DNA, et/ou par la protéine virale Tat, entraîne une hyperacétylation et un remodelage de nuc-1, éliminant ainsi le blocage de la transcription (Colin and Van Lint, 2009b).

Dans le contexte des mécanismes de latences dans les cellules microgliales, une étude a observé une augmentation des niveaux de CTIP2, HP1, MeCP2 et HDAC1 dans des tissus cérébraux post-mortem de patients VIH-1, en phase de latence (Desplats et al., 2013). Plusieurs études et essais cliniques de réactivation de la latence, utilisant des HDACis ont été publiés. Etant déjà utilisés dans le traitement d'autres pathologies, le vorinostat ou l'acide suberoylanilide

hydroxamic (SAHA), le panobinostat, l'entinostat, la romidepsine et l'acide valproïque (VPA) sont, probablement, les agents réactivateurs de la latence (LRA) virale les plus étudiés (Delagrèverie et al., 2016). Cependant, les essais cliniques n'ont, à ce jour, pas permis de démontrer une réduction de la taille du réservoir, et ceci, malgré une réversion efficace de la latence virale. Ces résultats soulignent la nécessité d'évaluer d'autres classes de LRAs, seules ou en combinaison avec des HDACis (Pettravic et al., 2017).

b- La méthylation des histones H3 du génome viral

Les marques de H3K4me₃, au niveau du promoteur, de H3K36me₃ et H3K79me₃, dans les régions intra géniques sont fortement associées à des séquences transcriptionnellement actives (Turner and Margolis, 2017). Toutefois, la marque H3K4me₃, a, également, été retrouvée associée au promoteur du VIH-1 latent (Kim et al., 2017). Effectivement, l'histone déméthylase LSD1, initialement décrite pour éliminer les groupes méthyles de H3K4 mono et diméthylé, est recrutée au promoteur du VIH-1 de façon concomitante aux marques H3K4me₃ et H3K9me₃. Cette augmentation de H3K4me₃, induite par LSD1, pourrait s'expliquer par sa capacité à recruter hSET1 et WDR5, deux membres du complexe hCOMPASS, au niveau du promoteur, plutôt qu'à sa propre activité enzymatique de déméthylase (Le Douce et al., 2012). LSD1 coopère fonctionnellement avec CTIP2 pour réprimer la transcription virale dans les cellules microgliales (Le Douce et al., 2012). Inversement, une étude a observé une augmentation des niveaux de H3K4me₃ lors de l'activation au TNF- α . Cependant, cette marque a été observée au niveau de Gag, mais pas au LTR (Zhou et al., 2004). La marque active de transcription H3K79me₃ est liée à une élongation transcriptionnelle. Néanmoins, l'extinction de la seule H3K79 méthyltransférase connue DOT1L, a entraîné l'activation du LTR, ce qui suggère que cette marque peut être inhibitrice de l'expression virale (He et al., 2011). Pour ce qui concerne la marque de H3K36me_{2/3}, elle a été observée dans les régions codantes du VIH-1 à la suite du recrutement de la méthyle-transférase SETD2. A ce jour, aucun travail n'a examiné le rôle de cette marque dans la régulation transcriptionnelle du VIH-1 (Turner and Margolis, 2017).

4.3.2.2- Les marques d'histones associées à une répression transcriptionnelle du VIH-1

a- La méthylation des H3K9 au promoteur viral

Les HMTs Suv39h1 (Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1), et G9a, qui induisent, respectivement, les marques H3K9me₃ et H3K9me₂, présentent un rôle dans la latence transcriptionnelle du VIH-1 (du Chéné et al., 2007; Imai et al., 2010; Marban et al., 2007), (figure 34). La présence de ces HMTs finissent par recruter HP1, qui intervient dans la

compaction de la chromatine par homodimérisation et répression du promoteur LTR (du Chéné et al., 2007; Marban et al., 2007). Notre laboratoire a démontré que dans le modèle de cellules microgliales, SUV39h1 est recruté au promoteur du VIH-1 par CTIP2, pour créer un environnement d'hétérochromatine (Marban et al., 2005). Une autre HMT G9a-like (GLP) est, également, impliquée dans le maintien de la latence du VIH-1, en catalysant la marque H3K9me2 (Ding et al., 2013).

Récemment, un complexe nommé HUSH (Human Silencing Hub), a été décrit pour recruter SETDB1 afin d'induire la marque H3K9me3 et la formation d'hétérochromatine, sans recrutement d'HP1. L'extinction de l'expression de HUSH a induit une diminution de H3K9me3 et a entraîné la dérégulation du VIH-1 dans des modèles de latences Jurkat (Tchassovnikarova et al., 2015). De même, l'extinction de l'expression de SETDB1 dans un modèle de latence, établi dans des lignées myéloïdes, a démontré son importance dans la répression du LTR (Tchassovnikarova et al., 2015).

b- La méthylation des H3K27 au promoteur viral

En plus de la méthylation de H3K9, le groupe de Jonathan Karn a démontré que l'HMT EZH2, membre du complexe polycombe PRC2, est présente à des niveaux élevés au promoteur du VIH-1 latent. La marque H3K27me3 contribuerait donc à la latence post-intégrative du VIH-1 dans les lymphocytes TCD4+ (Friedman et al., 2011), (figure 34).

Le traitement des cellules Jurkat et des modèles de cellules primaires d'infections latentes avec l'inhibiteur d'EZH2, GSK-343, en combinaison avec d'autres LRAs tels que SAHA et JQ1 (un inhibiteur de la famille des protéines BET) entraîne de fortes réactivations de la latence virale. Ces résultats confirment le rôle actif d'EZH2 dans l'établissement de la latence (Tripathy et al., 2015). Ce travail a, également, démontré la présence du Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) au promoteur latent. Le complexe PRC1 inhibe la transcription par monoubiquitination de l'histone H2A, qui sert de plateforme de recrutement aux sous-unités du complexe PRC2, afin de promouvoir la marque H3K27me3 (Kalb et al., 2014). Plus récemment, il a été montré que CBF1 est le facteur qui favorise le recrutement de ces complexes polycombes au promoteur viral, pour favoriser l'établissement et le maintien de la latence du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4+ (Zicari et al., 2017).

Outre les HDACs, les inhibiteurs d'histones méthyltransférase (HMTI) représentent, également, une classe thérapeutique à privilégier dans la purge des réservoirs latents du VIH-1. Quelques inhibiteurs spécifiques de la lysine méthyltransférase sont décrits. La chaetocine inhibe spécifiquement Suv39h1. La 3-Déazaneplanocine A (DZNep), GSK-343 et EPZ-6438 inhibent EZH2. Le BIX-01294 ou le UNC-0638 agissant respectivement sur les HMT G9a et

GLP (Shang et al., 2015). Ces molécules sont décrites pour leur capacité à réactiver le VIH-1 latent dans des modèles de lignées cellulaires latentes et de cellules T CD4+ primaires de patients sous HAART. Un effet synergique a été observé lors de la combinaison de ces traitements avec SAHA (Bouchat et al., 2012; Friedman et al., 2011; Nguyen et al., 2017).

c- La méthylation des H3R26 au promoteur viral

La présence de la marque H3R26me au promoteur viral est générée par l'enzyme CARM-1 (Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1). Cette marque épigénétique régule, négativement, le recrutement du SEC. H3R26me servirait de boucle de rétrocontrôle négatif à la marque activatrice H3K27ac. Ainsi, l'inhibiteur de CARM1 (7 g Millipore) réactive le VIH-1 dans des modèles de cellules T CD4+, en culture primaires. Par combinaison à d'autres LRAs (JQ1, SAHA ou vorinostat) des effets synergiques sur la réactivation du VIH-1 ont été observés (Zhang et al., 2017), (figure 34).

d- La méthylation des H4K20 au promoteur viral

Un criblage à base de RNAi (RNA interference) des lysines méthyltransférases humaines a identifié la protéine SMYD2 (SET and MYND Domain-containing protein 2) comme une enzyme qui contribue à la latence du VIH-1. SMYD2 est retrouvée associée au promoteur viral latent avec un enrichissement de la marque de H4K20me et de la protéine L3MBTL1 (Lethal 3 Malignant Brain Tumor 1), qui a la propriété de lier les histones monométhylées et d'induire une compaction de la chromatine. La déplétion de SMYD2 ou son inhibition pharmacologique (AZ391) a entraîné la réactivation du VIH-1 latent dans les lignées lymphocytaires T et dans des cellules primaires T CD4+ infectées latentes de patients sous HAART, avec réduction de la marque H4K20me. Ces travaux suggèrent le rôle potentiel des inhibiteurs de SMYD2 en qualité de LRA dans les stratégies de purges des réservoirs (Boehm et al., 2017), (figure 34).

4.3.3- La méthylation du DNA

La méthylation du DNA constitue un mécanisme supplémentaire qui intervient dans le renforcement de la latence du VIH-1 (Blazkova et al., 2009). La méthylation du DNA est assurée par des enzymes : les DNA méthyltransférases ou DNMTs qui catalysent l'ajout d'un groupement méthyl (-CH₃) sur le carbone 5 des résidus cytosine situé au sein du dinucléotide CpG, à partir d'un donneur de méthyl, la SAM. Dans le génome humain, la majorité (80%) des sites CpG (Cytosine phosphate Guanine) méthylés sont retrouvés dans des séquences répétées de types rétrotransposons et dans les DNA satellites. Environ 15% des sites CpG sont trouvés sous forme d'îlots (dont la longueur est comprise entre 300 et 3000 pb) dans les régions promotrices de 70% des gènes. Ces sites sont hypométhylés afin de servir de sites d'initiation

de la transcription. Toutefois, certains de ces îlots CpG peuvent être méthylés pour entretenir un état transcriptionnellement inactif (Long et al., 2017). Le site d'initiation de la transcription du VIH-1 est flanqué par deux îlots CpG méthylés dans les modèles de lignées lymphocytaires T et de cellules T CD4⁺ primaires de VIH-1 latent (Kauder et al., 2009). La méthylation du DNA interfère avec la transcription de 2 façons : soit par encombrement stérique, empêchant la fixation des facteurs de transcriptions, ou par liaison des protéines MBD (Methyl-CpG-Binding Domain proteins) aux CpG méthylés, qui interagissent à leur tour avec des HMTs et avec des HDACs, conduisant à une structure d'hétérochromatine (Colin and Van Lint, 2009b).

Un analogue de la cytosine modifiée en position 5, le 5-aza-2'-désoxycytidine (5-Aza-CdR, decitabine), actuellement utilisé dans le traitement du cancer, diminue la méthylation dans les deux îlots CpG du VIH-1. Ce composé entraîne la perte de MBD2 et HDAC-2 du CpG 2 du promoteur viral, avec une réactivation transcriptionnelle partielle. Le 5-Aza-CdR est, également, capable d'induire la dégradation protéasomale de la DNMT1. Un effet synergique entre le 5-Aza-CdR et l'activateur de la voie PKC (Protein Kinase c), la prostratine, a été observé sur la réactivation (Pour revue (Van Lint et al., 2013)). Pour ce qui concerne la combinaison 5-Aza-CdR et HDACis, certaines études n'ont montré aucun effet synergique (Kauder et al., 2009). Néanmoins, le groupe de Van Lint a, récemment, montré l'importance d'un traitement séquentiel à base de 5-Aza-CdR et HDACis pour atteindre un effet synergique sur la réactivation du VIH-1 dans les lignées T infectées latentes et dans des cultures de cellules primaires T CD4⁺ de patients avirémiques sous HAART (Bouchat et al., 2015).

Il est à noter que le rôle de la méthylation du DNA dans l'établissement de la latence du VIH-1 a souvent été controversé, en raison de l'observation de résultats divergents sur le statut de la méthylation du LTR5' chez les patients. Ces résultats suggèrent que la méthylation du DNA ne serait pas le seul mécanisme responsable de la latence du VIH-1 et que des études sur de plus grandes cohortes de patients permettraient de tirer une conclusion significative (Kumar et al., 2015). La figure 34 englobe toutes les modifications décrites sur le promoteur du VIH-1 latent.

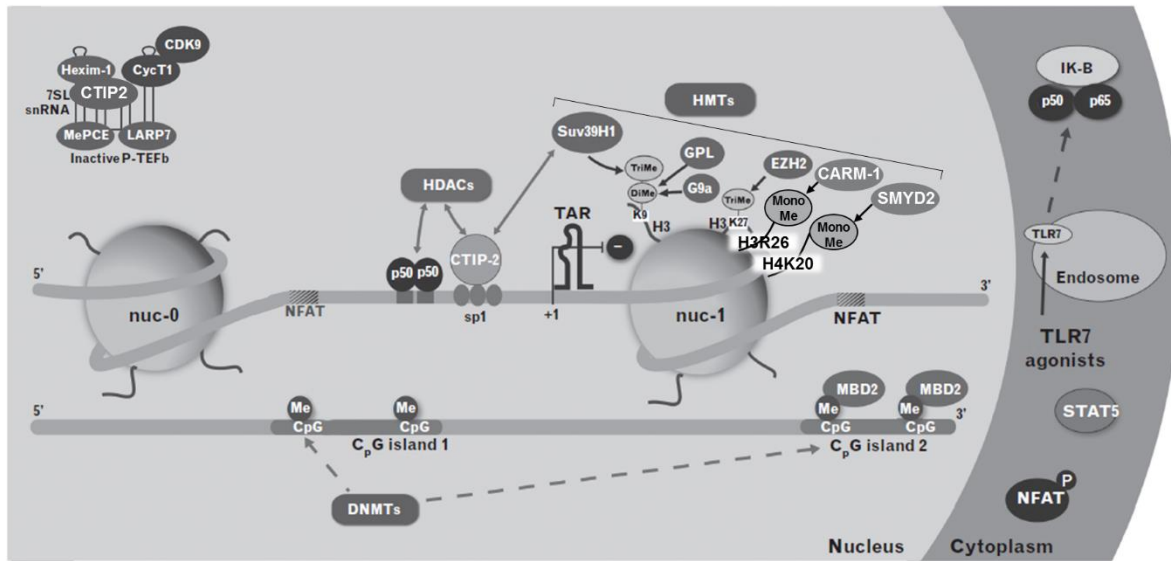


Figure 34 : Mécanismes moléculaires de latence du VIH-1. Pendant la latence, les facteurs cellulaires nécessaires à la transcription virale sont séquestrés dans le cytoplasme (NF-kB et NFAT) et dans des complexes inactifs dans le noyau (P-TEFb). L'initiation et/ou l'élongation de la transcription sont bloqués par nuc-1, qui est maintenu hypoacétylé par recrutement des HDACs par différents facteurs. Les HMTs (Suv39h1, G9a, GPL, EZH2, CARM-1 et SMYD2) sont, également, recrutés. De plus, le promoteur proviral du VIH-1 est hyperméthylé par des DNA méthyltransférases (DNMTs) dans deux îlots CpG entourant le site d'initiation de la transcription ((Darcis et al., 2016) avec modifications).

4.4- La régulation post-transcriptionnelle de la latence

Bien qu'une attention particulière ait été portée sur le rôle de la chromatine et des facteurs de transcription sur le contrôle de l'expression du VIH-1, des mécanismes post-transcriptionnels, tel que le transport inefficace et les modifications épigénétiques des mRNA viraux, ont été impliqués dans la régulation de l'expression des gènes du VIH-1.

Comme mentionné précédemment, la génération de virus infectieux nécessite la synthèse et l'export des RNA génomiques partiellement épissés et non épissés vers le cytoplasme par la protéine virale Rev. Dans les cellules T quiescentes de patients VIH-1 sous HAART, les transcrits Tat et Rev sont retenus dans le noyau, entraînant, ainsi, un défaut d'export des RNA viraux vers le cytoplasme (Lassen et al., 2006). Ce défaut d'export des RNA viraux pourrait être évité par l'expression de la protéine de liaison au RNA PTB (Polypyrimidine Tract Binding protein). En effet, les facteurs associés à PTB, PSF (PTBP associated Splicing Factor) et Matrin 3 sont capables de lier le RNA du VIH-1 et d'intervenir en tant que cofacteur de l'export médié par Rev. L'extinction de Matrin 3 et PSF pourrait contribuer à l'établissement de la latence (Kula et al., 2013). Une étude récente a révélé un mécanisme supplémentaire de régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes du VIH-1 par modification réversible des résidus d'adénosines du mRNA viral. Il a été démontré que ce mécanisme régulait positivement l'export nucléaire médié par Rev et l'abondance des mRNA viraux (Lichinchi et al., 2016). La

méthylation des résidus adénosines A7883 et A7877 par METTL3/METTL14 du RRE s'est révélée importante à l'interaction RRE-Rev. Les auteurs de ce travail ont montré que seule la mutation du résidu A7883 a un impact sur l'export nucléaire des mRNA et la réplication virale (Lichinchi et al., 2016). L'épitranscriptomique est un domaine en plein essor dans la recherche virologique qui permet d'intéressantes investigations sur les modifications post-transcriptionnelle du RNA viral dont l'impact sur la réplication virale pourrait affiner notre compréhension du cycle de vie ainsi que l'établissement de la latence du VIH-1.

4.5- MicroRNA et latence

Les microRNA (miRNA) sont des RNA non codants de 20-22 nucléotides codés par le génome eucaryote. Ils agissent comme des facteurs clés de la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Les Pri-miRNA (Primary-miRNA) sont, séquentiellement, pris en charge par la RNase III Drosha dans le noyau et Dicer dans le cytoplasme, pour générer des miRNA matures, qui interagissent avec une séquence complémentaire dans la région 3' non traduite des mRNA cibles. En fonction du niveau d'homologie, cet appariement entraîne l'inhibition traductionnelle ou la dégradation du mRNA (Colin and Van Lint, 2009b).

La régulation de l'expression et la production virales par les miRNA, a été associée à la latence. Plusieurs des miRNA, impliqués dans ce processus, sont exprimés dans les cellules quiescentes, mais sont régulés négativement lors de l'activation des lymphocytes T. De même, il a été montré que la faible susceptibilité des monocytes et la plus grande sensibilité des macrophages à l'infection par le VIH-1 sont, respectivement, liées à une expression élevée ou faible de ces miRNA. De plus, les microRNA régulent la latence du VIH-1, en ciblant, indirectement, les transcrits de facteurs importants à la réplication virale. Différents miRNA ont été décrits pour cibler la cycline T1 et PCAF dans les monocytes et les T CD4+ quiescentes (pour revue (Kumar et al., 2015)).

Bien que la présence de miRNA dans le VIH-1 soit un sujet très controversé, la présence de miRNA dérivés de TAR, dans les cellules T CD4+ infectées, pourrait réprimer l'expression des gènes viraux et réguler l'établissement de la latence (Klase et al., 2007).

5- Les stratégies actuelles qui visent l'élimination du réservoir latent

Depuis la découverte des premiers cas d'infection par le VIH-1 en 1981, la guérison des patients a toujours été le Graal des praticiens et des chercheurs. Actuellement, deux stratégies sont à l'étude : la première vise une guérison stérilisante, qui inclut des stratégies curatives visant à éliminer toutes traces de virus, et la 2^{ème} consiste en une guérison fonctionnelle par réduction

de la taille des réservoirs, afin d'atteindre un contrôle à long terme de la réplication virale, en l'absence de traitement.

La guérison stérilisante a pour objectif de reproduire le fameux cas du patient de Berlin. À ce jour, la seule personne guérie du VIH-1 est ce patient de Berlin VIH-1 positif, qui a été traité pour une leucémie aiguë myéloïde. Il a reçu une greffe de cellules hématopoïétiques allogéniques à partir d'un donneur porteur d'une mutation homozygote du récepteur CCR5, désignée CCR5 $\Delta 32/\Delta 32$, dont les cellules T CD4⁺ sont résistantes à la plupart des souches du VIH-1. Il est, actuellement, sans traitement depuis 11 ans (Yukl et al., 2013b). Il est à préciser que le traitement du patient de Berlin est associé à un risque de mortalité très élevé. Il ne garantit pas l'éradication du virus, et il n'est pas envisageable de le généraliser à l'ensemble des patients VIH⁺. Ainsi, les patients de Boston, ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques avec des cellules non résistantes au VIH-1, suite au développement d'un lymphome de Hodgkin, ont connu un rebond viral, dû à la présence d'une infime source de cellules hôtes dans le sang périphérique (Henrich et al., 2013). Le Mississippi baby, dont la mère était infectée par le VIH-1 et non traitée, a reçu une thérapie antirétrovirale dès 30 h après sa naissance et jusqu'à l'âge de 18 mois. Bien que le DNA proviral dans les PBMC, la virémie plasmatique et les anticorps anti-VIH-1, soient restés indétectables à 30 mois, un rebond de la virémie a été détecté 2 ans après l'arrêt du traitement (Persaud et al., 2013).

Compte tenu de la difficulté de réaliser une guérison stérilisante, la guérison fonctionnelle des patients est devenue une priorité de la recherche mondiale. Le système immunitaire de rares « élites contrôleurs » maintient le VIH-1 à de faibles taux plasmatiques, sans nécessité de traitement. Bien que la capacité de ces patients à contrôler la réplication virale ne soit pas, complètement, comprise, leurs cellules dendritiques myéloïdes circulantes, leurs cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺ sont plus efficaces pour dépléter des lymphocytes T CD4 infectés. De plus, la présence d'anticorps neutralisants et le haut degré de méthylation du promoteur viral sont impliqués dans le retard de la progression de la maladie. On notera que ces patients ont un réservoir infecté latent bien plus faible que les patients sous traitements (Autran et al., 2011). Un autre exemple de contrôle immunitaire concerne les patients de la cohorte VISCONTI (Viro-Immunological Sustained Control after Treatment Interruption). Ils contrôlent, durablement, la virémie à l'arrêt des traitements, qui ont été initiés très tôt pendant la phase aiguë de l'infection. Ces 14 patients n'ont pas présenté de rebond de virémie, même après 10 ans d'arrêt de traitement. Cependant, la virémie de ces patients reste détectable par des tests sensibles (Sáez-Ciri3n et al., 2013).

Actuellement, 2 approches, permettant une guérison fonctionnelle, sont envisagées. L'approche nommée « shock and kill » a été, largement, étudiée dans le but de réactiver le virus et d'éliminer les cellules infectées. La 2^{ème} stratégie « block and lock » consiste à rendre le VIH-1 silencieux de façon permanente.

5.1- La stratégie du « shock and kill »

Elle est basée sur l'utilisation de LRAs (figure 35 et tableau 1), pour réactiver la transcription et la réplication du VIH dans les cellules T CD4+ infectées latentes, afin de les rendre visibles aux cellules T CD8+ cytotoxiques spécifiques du VIH et aux cellules NK.

Initialement, il a été supposé que la réactivation virale pourrait être obtenue avec un seul type de LRA, à savoir : les HDACis ou les inducteurs PKC, ce qui suffirait à diminuer la taille du réservoir latent. Aujourd'hui, il est, largement, admis que des combinaisons de deux agents ou plus, avec un mécanisme d'action différent, sont nécessaires, (figure 35). Ces approches comprennent : (1) les traitements ciblant la libération des facteurs de transcription cellulaire séquestrés, essentiels à l'initiation ou l'élongation de la transcription virale (NF-kB, NFAT, P-TEFb), (2) la modulation épigénétique du promoteur viral pour favoriser la transcription et (3) la clairance immunitaire des cellules réactivées « Kill ».

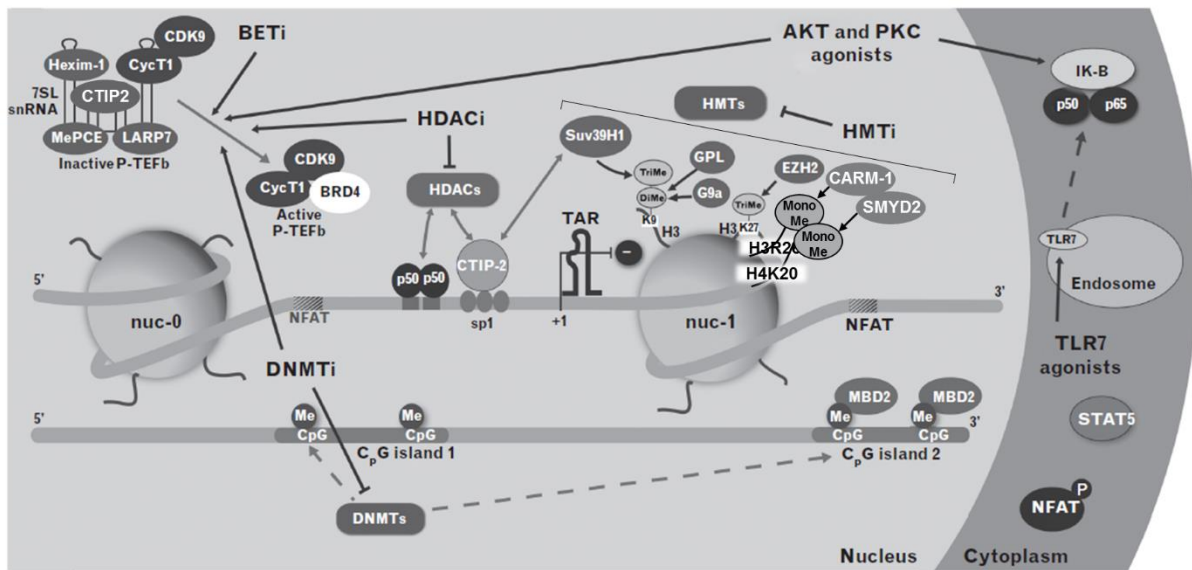


Figure 35 : Les agents réactivateurs de la latence du VIH-1 (Darcis et al., 2016).

a- Les agents ciblant les facteurs de transcription cellulaire

Dans le cadre de la stratégie du « shock », et parmi les agents ciblant les facteurs de transcription cellulaire, les études ont inclus des agonistes de PKC (prostratine, bryostatine), qui activent la voie NF-kB aboutissant à une très forte initiation de la transcription virale. Cependant, ces agents sont toxiques et les études cliniques ont montré très peu d'effet à des doses tolérables.

Des expériences prometteuses ont été obtenues, *in vitro*, avec L'HMBA et le Disulfiram. Ces 2 composés entraînent l'inversion de la latence en stimulant, respectivement, la libération de P-TEFb et l'activation de la voie AKT. Toutefois, deux essais cliniques chez l'homme, avec le Disulfiram, n'ont montré qu'une activation modeste du réservoir latent de cellules T, avec des preuves indéterminées d'une réduction de sa taille (pour revue (Thorlund et al., 2017)).

Les agonistes des récepteurs TLR (Toll-Like Receptor), ont montré leur efficacité à réactiver l'expression et l'immunité spécifique du VIH chez les patients recevant un traitement antirétroviral. Récemment, le traitement de singes Rhésus SIV-positifs sous HAART, par un agoniste du TLR7, a entraîné une activation réversible des T CD8 et une activation modeste des cellules T CD4 (Borducchi et al., 2016). Un essai clinique de phase I a permis d'examiner les effets de l'agoniste du TLR-9 MGN1703 chez 15 patients VIH-1 avirémiques. Dans cet essai, les cellules T CD8+ et NK ont, significativement, augmenté, suggérant une meilleure réponse immunitaire virale. Chez 6 des 16 participants, la charge virale a augmenté de < 20 à > 1500 copies/ml, évoquant une réactivation du réservoir latent (Vibholm et al., 2017). Deux autres essais cliniques sont prévus pour étudier les effets des agonistes TLR sur l'inversion de la latence (pour revue (Thorlund et al., 2017)).

b- Les agents induisant une modulation épigénétique

Les inhibiteurs d'HDAC sont les agents pharmaceutiques les plus étudiés pour stimuler la transcription virale, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les essais cliniques avec ces agents (vorinostat, panobinostat et disulfiram), n'ont, par contre, entraîné aucune réduction significative du réservoir viral latent (lymphocytes T mémoires), bien qu'il y ait eu des preuves d'activation des cellules infectées (Archin et al., 2012; Elliott et al., 2015). Malgré les résultats non satisfaisants de ces premiers essais cliniques, des études avec ces traitements, seuls ou en combinaison avec des immunostimulants tels, que les agonistes TLR, ou à des agents qui bloquent les voies inhibitrices (anticorps anti-PD-1), sont prévus ou en cours (Delagrèverie et al., 2016).

Une autre classe de LRA, qui comprend des inhibiteurs d'HMT (chaetocine et BIX-01294) (Bouchat et al., 2012), et des agents de déméthylation du DNA (5-Aza-CdR) (Bouchat et al., 2015), ont démontré leur capacité à inverser la latence *in vitro* et/ou *ex vivo*, mais n'ont pas été testés *in vivo* (Thorlund et al., 2017).

Study	Drug Studied	Patient Eligibility	No. Pts	Study Design	Tx Dose and Duration	Length of Study	Key findings
Agents targeting cellular transcription factors							
Lehrmann 2005	Valproic Acid (HDACi)	Viral RNA < 50cp/mL for at least 2 years	4	Proof-of-concept	500-750 mg bid for 3 months	18 weeks	68%–83% reduction in resting infected CD4 T-cells in 3 of 4 patients
Sagot-Lerolle et al. 2008	Valproic Acid (HDACi)	Viral RNA < 50cp/mL for at least 2 year	24	Retrospective matched cohort study (pilot)	Not reported (retrospective)	2 years	No difference in viral DNA quantified in PBMCs
Archin 2010	Valproic Acid (HDACi)	Viral RNA < 50cp/mL for at least 6 months; healthy CD4 T-cells >300/μL	12	Single arm phase 1 trial	1000 mg qd (Depakote ER)	16 weeks	No sustained depletion of resting CD4+ T-cell infection observed
Routy et al. 2012	Valproic Acid (HDACi)	Viral RNA < 50cp/mL for at least 1 year; healthy CD4 T-cells >200/μL	56	Multicenter randomized cross-over trial	Up to 500 mg bid (as per tolerance)	16 weeks (× 2)	No reduction in CD4 T-cells with replication-competent HIV
Elliot et al. 2014	Vorinostat (HDACi)	Not reported Baseline CD4 T-cell count range from 371 to 1136	20	Proof-of-concept single arm	400 mg bid for 14 days	12 weeks	Cell-associated unspliced RNA Increased by 7.4 fold at 14 days
Archin et al. 2013	Vorinostat (HDACi)	Viral RNA < 50cp/mL for at least 6 months; healthy CD4 T-cells >300/μL	11	Proof-of-concept single arm	200 mg initially 400 mg after 2–3 and 4–5 weeks	5 weeks	RNA expr. in resting CD4+ T-cells increased 4.8 fold (1.5–10)
Rasmussen et al. 2014	Panobinostat (HDACi)	Viral RNA < 50cp/mL for at least 2 years; healthy CD4 T-cells >500/μL	15	Phase 1/2	20 mg three times/week for 8 weeks	32 weeks	Cell-associated RNA Increased during treatment by 3.5 fold
Soegaard 2015	Romidepsin	Viral RNA < 50cp/mL for at least 2 years; healthy CD4 T-cells >500/μL	6	Proof-of-concept phase II	One 4 h 50 mg infusion per week for 3 weeks	70 days after last infusion	Plasma RNA increased to detectable levels in 5/6 patients
Katlama 2016	IL-7 agonist Raltegravir Maraviroc	Viral RNA < 200cp/mL last 3 years, <50cp/mL last 6 months, CD4 T-cells >350/μL	29	Randomized trial	8 weeks of RAL + MAR intensification, then 3 x weekly 30mcg/kg of IL-7	28 weeks	Data safety monitoring board stopped trial at 28 weeks due to concerns of >1500 CD4+ T-cell counts
Levy Y 2012	IL-7 recombinant	Viral RNA < 50cp/mL for at least 6 months; healthy CD4 T-cells: 100–400/μL	32	Randomized trial	weekly 10, 20, or 30mcg/kg for 3 weeks	52 weeks	IL-7 well tolerated up to 20mcg/kg. Brisk increase in CD4 count.
Sereti 2009	IL-7 recombinant	Viral RNA < 50cp/mL (grp 1) Viral RNA < 50,000cp/mL (grp 2) for at least 12 months; healthy CD4 T-cells > 100/μL	25	Randomized double blind	Single dose of 3, 10, 30, 60 or 100μg/kg	8 weeks	30μg/kg max tolerable dose. Significant increase in transient HIV-RNA in 6 patients. Increase in central memory phenotype T-cells
Vibholm 2017	TLR-9 agonist (MGN1703)	Viral RNA < 50cp/mL for at least 12 months; healthy CD4 T-cells >350/μL	15	Phase 1/2a Single arm	60 mg MGN1703 subcutaneously twice weekly for 4 weeks	4 weeks (80 days follow-up)	Pronounced activation of plasmacytoid dendritic cells. Significant increase in proportions of activated cytotoxic NK cells and CD8+ T cells
Epigenetic modulation agents							
Elliott et al. 2015	Disulfram	Viral RNA < 50cp/mL for at least 3 years; healthy CD4 T-cells >350/μL	30	Non-randomized prospective dose-escalation	Three days of 500 mg, 1000 mg, or 2000 mg	30 days	Approximately 2-fold increase in cell-associated RNA
Spivak et al. 2014	Disulfram	Viral RNA < 50cp/mL for min 1 year; healthy CD4 T-cells >500/mcg for min 24 weeks	16	Pilot single arm	500 mg/day for 14 days	84 days	Well-tolerated, but latent reservoir did not change in size
Gutiérrez et al. 2016	Bryostatin-1	Viral RNA < 50cp/mL for at least 2 years; healthy CD4 T-cells >350/μL	12	Double-blind randomized phase I trial	Placebo 10mcg/mm ² 20mcg/mm ²	672 days	No detectable difference in cell-associated unspliced RNA

Tableau 1 : Vue d'ensemble des essais cliniques de réactivation de la latence (Thorlund et al., 2017).

c- La clairance immunitaire des cellules réactivées « Kill »

Les essais montrant un impact limité des HDACis sur la réduction de la taille du réservoir, suggèrent une activité sous-optimale de la cytotoxicité des cellules T CD8+ et des cellules NK, dont les HDACis supprimeraient la réponse. En outre, il a été, récemment, proposé que les LRAs pourraient entraîner la réactivation de mutants dominants du VIH, qui échapperaient à la réponse immunitaire. De même, les traitements prolongés par la HAART sont associés à une réduction importante de la fréquence des cellules T CD8+ spécifiques du VIH (Perreau et al., 2017). Ces observations ont convenu de la nécessité de stimuler les réponses des T CD8+ par des stratégies de vaccinations thérapeutiques. Celles-ci auront pour but d'augmenter la fréquence et la puissance des T CD8+, afin d'éliminer efficacement les cellules exprimant les antigènes viraux, issues de la réactivation par les HDACis. Actuellement, deux essais thérapeutiques, basés sur la l'association de romidepsin avec une vaccination thérapeutique, ont conduit à une diminution de la taille du réservoir viral, avec une virémie non détectable. Ces travaux suggèrent que la vaccination thérapeutique combinée aux LRAs, pourrait faciliter la clairance des cellules infectées par le VIH-1 (Leth et al., 2016) (NCT02616874).

De plus, la combinaison du vorinostat avec une combinaison d'anticorps neutralisants a retardé le délai du rebond viral, après interruption thérapeutique chez des souris humanisées (Halper-Stromberg et al., 2014). Actuellement, plusieurs essais cliniques dont l'objectif consiste à explorer la meilleure combinaison thérapeutique qui permettrait la guérison sont en cours.

5.2- La stratégie de guérison fonctionnelle ou « block and lock »

Compte tenu des obstacles qui entravent l'efficacité de l'approche du « shock and kill », une plus grande attention est maintenant accordée aux stratégies visant à réprimer complètement la transcription du VIH-1, (figure 36). La présence continue d'une réplication virale à bas bruit, souligne l'intérêt de développer des agents thérapeutiques, capables de supprimer les niveaux résiduels de transcription virale dans les cellules infectées latentes (Darcis et al., 2017).

Dans ce contexte, l'inhibiteur de Tat, la dCA, a montré sa capacité à inhiber *ex vivo* la réplication virale résiduelle sous HAART et à prolonger le délai de réactivation virale après interruption des traitements. La dCA réduit la taille du réservoir viral dans le cerveau et les tissus lymphoïdes de souris humanisées (Kessing et al., 2017).

Actuellement, plusieurs agents sont identifiés pour leur capacité à être utilisés en tant que LPAs (Latency Promoting Agents) dans le but d'assurer une guérison fonctionnelle, (figure 36) :

- Le triptolide qui est en phase III d'essais cliniques (NCT02219672).

- Le peptide anti-tumoral, G1V001, qui supprime la transcription et la réactivation virale par inhibition de la voie NF- κ B (Kim et al., 2016).
- Curaxine 100 (CBL0100), qui bloque à la fois la réplication et la réactivation du VIH-1 dans des modèles de latences *in vitro* et *ex vivo*, en diminuant l'occupation de la RNA Pol II au promoteur viral (Jean et al., 2017).
- Levosimendan utilisé pour traiter l'insuffisance cardiaque, inhibe fortement la réactivation du VIH-1 induite par le TNF α dans des lignées cellulaires de latence virale, en affectant l'axe transcriptionnel Tat-LTR. En outre, le levosimendan inhibe à la fois la réactivation et la réplication du VIH-1 latents dans les cellules T CD4+ primaires (Hayashi et al., 2017).
- Les shRNA ciblant les sites NF- κ B du promoteur, ont réussi à inhiber la réplication du VIH-1 dans des souris humanisées, reconstituées avec des PBMCs humaines, transduites avec ces shRNA. Une autre étude avait, précédemment, montré que cette suppression d'infection virale a été associée à la viral méthylation des îlots CpG dans le LTR5'. Il est à noter que le système de délivrance, l'efficacité et la sécurité de ces siRNA ou shRNA doivent être pris en compte dans de futures études (Suzuki et al., 2005, 2013).

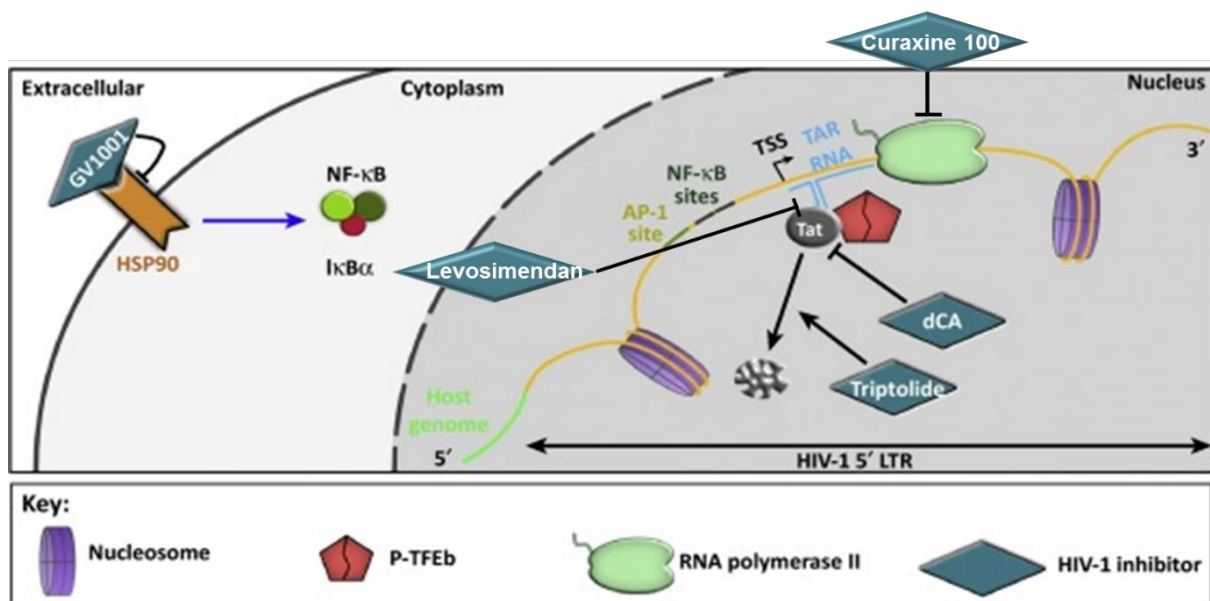


Figure 36 : La stratégie du « block and lock ». Représentation schématique de nouveaux composés, récemment découverts, visant à maintenir et renforcer la répression de l'expression du VIH-1 ((Darcis et al., 2017) avec modifications).

La machinerie de sumoylation

Découverte en 1997, la machinerie de sumoylation modifie diverses protéines eucaryotes dans des organismes allant de la levure à l'homme. Des analyses protéomiques de sumoylation ont permis d'identifier plus de 580 cibles endogènes dans des cellules HeLa, ce qui correspond à environ 2% du protéome. La modification post-traductionnelle des protéines par l'ajout d'un ou plusieurs SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) est réversible et régule divers processus cellulaires, telles que la transcription, la réplication, la ségrégation des chromosomes, la réparation du DNA, la dégradation protéique et la localisation cellulaire. La voie de Sumoylation est impliquée dans un certain nombre de maladies comme le Cancer, Parkinson, l'épilepsie, Alzheimer et l'anémie de Fanconi (Yang and Chiang, 2013).

1- Les protéines SUMO

La sumoylation est une modification post-traductionnelle hautement conservée chez tous les eucaryotes et nécessaire à la viabilité de la plupart de leurs cellules. Chez mammifères, les protéines SUMO comprennent quatre composants SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 et SUMO-4. SUMO-1, SUMO-2 et SUMO-3, sont exprimés de façon ubiquitaire. SUMO-4 est, seulement, exprimé dans le rein, les ganglions lymphatiques et la rate. SUMO-1 est une protéine de 11,6 kDa à 101 acides aminés. SUMO-2 (92 acides aminés) partage 97% d'homologie avec SUMO-3 (93 acides aminés). SUMO-2/3 ne partagent que 50% d'homologie avec SUMO1. Malgré cette faible homologie, SUMO-1 et SUMO-2/3 partagent des structures tridimensionnelles très similaires ; elles sont activées et conjuguées par la même enzyme. SUMO-4 est non conjuguée dans les conditions physiologiques, c'est un mécanisme post-traductionnel potentiel dans le stress oxydatif et les lésions hypoxiques. La plupart des protéines cibles sont modifiées, exclusivement, par SUMO-1, qui reste le plus dominant parmi les quatre. D'autres protéines sont conjuguées à SUMO-2/3 ou à tous les paralogues SUMO. Il est à préciser que les SUMO-2/3 sont capables de former des chaînes sur les protéines substrats, tandis que les chaînes SUMO-1 ont été rapportées *in vitro*. *In vivo*, il semble que SUMO-1 agit comme un terminateur de chaîne sur les polymères SUMO-2/3. SUMO1 existe, principalement, sous la forme conjuguée, tandis que SUMO2/3 sont détectés, principalement, sous sa forme non conjuguée. Cela ne signifie pas que SUMO1 est le modificateur principal ; en effet, les cellules mammifères expriment 10 fois plus SUMO2/3 que SUMO1, et les transitions entre sumoylation et désomoylation prennent plus de temps pour SUMO-1 que pour SUMO-2/3 (pour revue (Chymkowitch et al., 2015; Flotho and Melchior, 2013)). Diverses études protéomiques ont

montré que SUMO peut subir des modifications post-traductionnelles, y compris l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination. Actuellement, seules l'acétylation et la phosphorylation de SUMO sont analysées en détail : l'acétylation de SUMO (SUMO1 Lys37 ou SUMO2 Lys33) interfère sur sa liaison avec un motif SIM (SUMO Interaction Motif), défini ci-dessous. La phosphorylation de SUMO1 sur Thr76 semble réguler sa stabilité et son activité, mais les mécanismes moléculaires de fonctionnement restent à résoudre (Pichler et al., 2017).

2- Le cycle de sumoylation

Les étapes enzymatiques de conjugaison des résidus SUMO à une protéine cible sont très similaires au processus d'ubiquitination. Cependant, le nombre d'enzymes impliquées dans la sumoylation est très faible, comparé à l'ubiquitination, qui consiste en plusieurs enzymes de conjugaison E2 et de ligase E3. Toutes les protéines SUMO sont exprimées en tant que précurseurs immatures, et doivent subir une activation par clivage des quatre derniers résidus dans son domaine C-terminal, grâce à l'activité hydrolytique des protéases spécifiques de SUMO, connues sous le nom de SENPs (Sentrin-specific Protéases). L'élimination de ce domaine C-terminal expose un motif diglycine « GG », conservé homologue à celui de l'ubiquitine, (figure 37). Dans une réaction ATP-dépendante, le motif « GG » est, ensuite, activé par adénylation, ce qui lui permet de former une liaison thioester, riche en énergie, avec la cystéine catalytique (Cys173) de l'enzyme E1 hétérodimérique, composée des sous-unités SAE1/SAE2 (Small Ubiquitin Like Modifier (SUMO) Activating Enzyme 1/2). Ensuite, SUMO est transféré à la cystéine (Cys93) de l'enzyme de conjugaison E2 UBC9 (Ubiquitin-Conjugating 9, nommée également Ube2I), résultant, à nouveau, en une liaison thioester. Il a été montré que la sumoylation de la sous-unité SAE2 sur la Lys236 altère son interaction avec l'enzyme E2. A l'étape finale, SUMO est transféré au substrat, formant une liaison isopeptidique avec le résidu lysine accepteur, (figure 37).

Bien que les enzymes SUMO E1 et UBC9 se soient révélées suffisantes à la sumoylation des protéines, la conjugaison de SUMO et la sélection des substrats peuvent être améliorées par des SUMO E3 ligases. La plupart des SUMO E3 ligases possèdent un domaine RING, qui interagit avec l'enzyme de conjugaison UBC9 et induit un changement conformationnel, qui facilite le transfert de SUMO au substrat (Chymkowitch et al., 2015; Pichler et al., 2017).

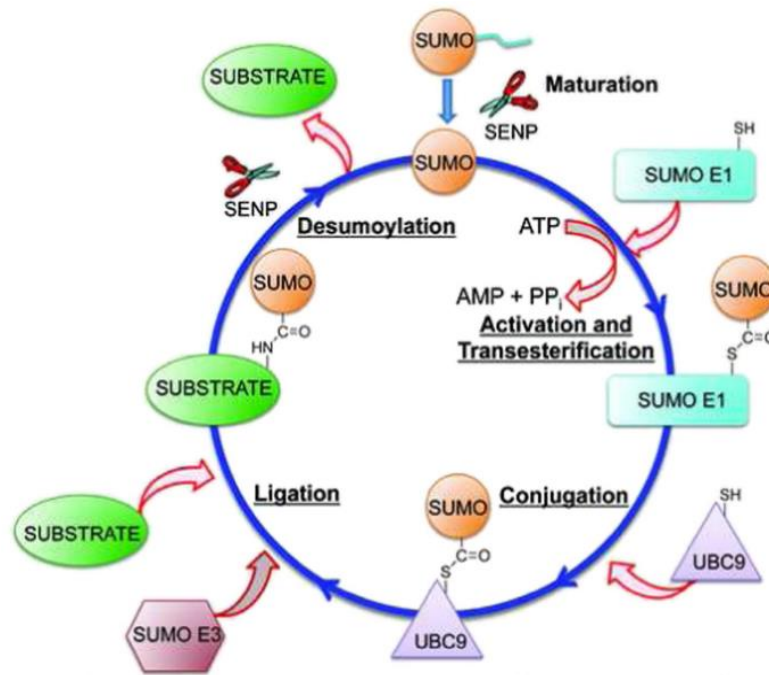


Figure 37 : Représentation schématique des étapes du cycle de sumoylation (Kumar and Zhang, 2015).

2.1- Sélection des sites cibles accepteurs de sumoylation

Deux éléments prérequis déterminent la possibilité d'une protéine à être sumoylée. Soit la protéine est capable d'interagir, directement, avec UBC9, soit elle est reconnue par une E3 ligase, spécifique, pour être amenée à proximité directe d'UBC9. Dans les deux cas, un résidu lysine accepteur doit avoir accès à la liaison thioester UBC9-SUMO. Actuellement, 3 mécanismes distincts permettent de déterminer la lysine à sélectionner, (figure 38) :

- Le site lysine accepteur est intégré dans un motif « ΨKxE » où Ψ et x signifient respectivement, un acide aminé hydrophobe et n'importe quel acide aminé, qui est, directement, reconnu par UBC9. Plusieurs variations de cette séquence consensus ont été identifiées, et peuvent être reconnues par UBC9, tel qu'un motif consensus inversé, hydrophobe ou dépendant de la phosphorylation (tableau 2).
- SUMO peut se lier de façon non covalente aux protéines cibles à l'aide d'un motif SIM, caractérisé par la présence d'un noyau hydrophobe et, dans certains cas, par un groupe de résidus acides d'acides aminés. La protéine cible, par son SIM, recrute le complexe UBC9-SUMO, permettant à UBC9 d'assurer la conjugaison SUMO des résidus lysine adjacents, en l'absence d'un motif consensus (Hecker et al., 2006).
- Enfin, les SUMO E3 ligases se lient, directement, à la cible et assurent le transfert de SUMO au résidu lysine accepteur, via UBC9 (Flotho and Melchior, 2013).

Motif	Consensus sequence
Consensus motif	Ψ KXE
Inverted consensus motif	(E/D)XK Ψ
Hydrophobic consensus motif	$\Psi\Psi\Psi$ KXE
Phosphorylation-dependent sumoylation motif (PDSM)	Ψ KXEXX(pS)P
Negatively charged amino acid-dependent sumoylation motif (NDSM)	Ψ KXEXXEEEE
Phosphorylated sumoylation motif (pSuM)	Ψ KX(pS)P ^a
Extended pSuM	Ψ KX(pS)P ^a (pS) XXX(pS)P

Tableau 2 : Les motifs consensus des sites accepteurs SUMO (Flotho and Melchior, 2013).

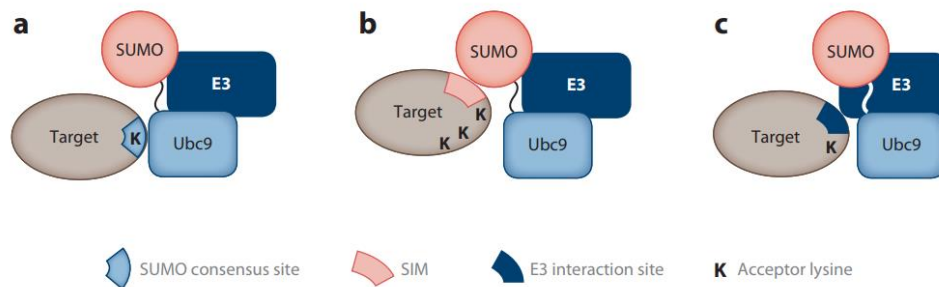


Figure 38 : Les mécanismes de reconnaissance des sites lysines accepteurs de SUMO. (a) Par un motif SUMO consensus, (b) par interaction avec un SIM, (c) par interaction avec une E3 ligase (Flotho and Melchior, 2013).

2.2- L'enzyme de conjugaison E2

UBC9 est une protéine ubiquitaire d'environ 17 kDa (environ 158 acide aminés), principalement exprimée dans le noyau et le complexe des pores nucléaires, mais aussi autour de l'enveloppe nucléaire, dans le cytoplasme et dans la membrane cellulaire (Varadaraj et al., 2014). Des expériences de ChIP ont montré qu'UBC9 lie la chromatine, avec un enrichissement spécifique, aux régions d'hétérochromatine (Shin et al., 2005). Par des expériences de mutagenèse, il a été démontré, qu'en plus du site catalytique en Cys93, qui est nécessaire au transfert de SUMO de l'enzyme E1 vers UBC9, et de cette dernière à la protéine substrat, la tyrosine Y134 joue, également, un rôle dans ce transfert (Alontaga et al., 2016). UBC9 est régulée positivement dans les tissus néoplasiques, ce qui fait d'elle un biomarqueur du cancer et une cible thérapeutique potentielle (Mattoscio and Chiocca, 2015). L'activité d'UBC9 est modulée par modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation de la Ser71 et Thr35, qui semble promouvoir la liaison thioester UBC9-SUMO, conduisant à une meilleure

capacité de conjugaison. La sumoylation de la K14 modifie les cibles préférentielles d'UBC9. De plus, l'acétylation d'UBC9 sur K65 en présence d'inhibiteurs de SIRT1 (sirtinol), réduit, préférentiellement, la sumoylation des protéines substrats à motif consensus chargé négativement (NDSM). Les autres substrats restent inchangés (Pichler et al., 2017).

2.3- Les SUMO E3 ligases

Un certain nombre de SUMO E3 ligases ont été décrites et classées en groupes. Les membres du premier groupe ont un domaine SP (Siz/PIAS) RING interne, similaire à celui trouvé dans les ubiquitines E3 ligases. Ces E3 ligases favorisent la modification par SUMO, en stabilisant l'interaction de la cible avec l'E2 chargée, l'amenant à proximité de la lysine cible. Les ligases de ce groupe englobent les protéines de la famille PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) (PIAS1, PIAS3, PIAS α , PIAS β et PIASy) et Mms21.

La nucléoporine RanBP2 représente le seul membre du deuxième groupe des SUMO E3 ligases. RanBP2 se lie à UBC9 et assure la sumoylation de Sp100 et HDAC4 par SUMO-1 et PML (Promyelocytic Leukemia protein) avec SUMO-2. L'activité SUMO ligase de RanBP2 réside dans un domaine répété interne, qui est engagé dans un complexe fonctionnel avec RanGAP1 sumoylé et UBC9. Ce complexe se localise au pore nucléaire, pendant l'interphase, où il peut sumoyler des protéines substrats au cours de l'import nucléaire.

Le troisième groupe comprend les E3 ligases, dépourvues du domaine RING, telles que Pc2 (Polycomb 2 homolog, aussi nommé CBX4 (Chromobox protein homolog 4)), qui contribue, également, à la sumoylation aux sites de lésions du DNA, d'HDAC4-5-7, TOPORS (Topoisomerase I-binding RING finger protein) et RHES (Ras Homolog Enriched in Striatum). De plus, des membres de la famille TRIM ont été, récemment, décrits comme un quatrième groupe de SUMO E3 ligases, nécessitant, à la fois, un domaine RING et B-box (domaines de liaison au zinc), pour stimuler la conjugaison de SUMO aux protéines cibles (pour revue (Mattoscio and Chiocca, 2015; Pichler et al., 2017)).

2.4- Les SUMO protéases

La sumoylation est un processus réversible, régi par des protéases spécifiques appartenant à la famille SENP, qui clivent la liaison isopeptidique entre la glycine C-terminale de SUMO et la lysine de la protéine substrat, libérant ainsi la protéine SUMO afin de permettre son recyclage. Six isoformes de SENP (SENP1, 2, 3, 5, 6 et 7) ont été identifiés chez les mammifères. Ces six SENPs peuvent être divisés en trois sous-familles, basées sur leur homologie de séquence, la spécificité du substrat et la localisation cellulaire. SENP1 et SENP2 constituent la première famille qui a une large spécificité pour SUMO-1/2/3. SENP3 et SENP5 forment la deuxième

famille, SENP6 et SENP7 la troisième. Misses à part SENP1 et SENP2, toutes les autres SENP préfèrent la déconjugaison de SUMO-2/3 à SUMO-1 (Kumar and Zhang, 2015).

SENP1, SENP6 et SENP7 sont localisées dans le nucléoplasme, tandis que SENP3 et SENP5 sont confinées aux nucléoles. Bien que SENP2 soit localisée dans le complexe des pores nucléaires, avec SENP1, elles possèdent un signal d'export et import nucléaire pour faciliter leur entrée et sortie du noyau. Alors que les six isoformes possèdent toutes une activité isopeptidase, seules SENP1, SENP2 et SENP5 peuvent effectuer la maturation protéolytique des précurseurs SUMO (Matunis and Rodriguez, 2016) (tableau 3 et figure 39).

SENP isoform	Specificity	Subcellular localization	Enzymatic activity	Amino acid residues
SENP1	SUMO-1/2/3	Nucleoplasm	Precursor processing, isopeptidase	643 Catalytic domain (419–643)
SENP2	SUMO-1/2/3	Nuclear pore	Precursor processing, isopeptidase	589 Catalytic domain (365–589)
SENP3	SUMO-2/3	Nucleolus	Isopeptidase	574 Catalytic domain (353–574)
SENP5	SUMO-2/3	Nucleolus	Precursor processing, isopeptidase	755 Catalytic domain (567–755)
SENP6	SUMO-2/3	Nucleoplasm	Isopeptidase	1112 Catalytic domain (637–1112)
SENP7	SUMO-2/3	Nucleoplasm	Isopeptidase	984 Catalytic domain (662–984)

Tableau 3 : Propriétés biologiques et structurales des isoformes SENPs (Kumar and Zhang, 2015).

Les SENPs partagent un domaine cystéine protéase catalytique, conservé en C-terminal (environ 200 acides aminés), qui a la triade catalytique typique (histidine-acide aspartique-cystéine). Le domaine N-terminal est quant à lui peu conservé, il est impliqué dans la régulation de la localisation des différents isoformes de SENPs, il est sujet à des modifications par phosphorylation ou ubiquitination, susceptibles d'affecter la stabilité des SENPs. Ce domaine N-terminal contient, également, un ou plusieurs SIM, qui contribuent à la reconnaissance des substrats sumoylés (Hickey et al., 2012).

Les niveaux de SUMO protéases varient en réponse à un certain nombre de stimuli. SENP1 est surexprimé dans le cancer de la prostate, mais son activité est inhibée dans des conditions de stress oxydatif. Inversement, des niveaux accrus de ROS stabilisent SENP3, et bloque son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Enfin, il est, également, rapporté que SENP2 est régulée par ubiquitination et dégradation par le protéasome (Flotho and Melchior, 2013).

D'autres classes de SUMO protéases, nommées DeSI1/2 (Desumoylating isopeptidase) et USPL1 (Ubiquitin-specific protease-like 1), ont été identifiées. DeSI1/2 sont localisées dans le

noyau et le cytoplasme, tandis qu'USPL1 est retrouvé dans le noyau. Contrairement aux SENPs, DeSI reconnaît un ensemble limité de cibles. Le répresseur transcriptionnel BZEL (BTB-ZF Protein Expressed In Effector Lymphocytes) est reconnu comme le seul substrat connu de DeSI qui est capable de dé-conjuguer à la fois SUMO1 et SUMO2/3 de BZEL. USPL1 interagit, spécifiquement, avec les 3 résidus SUMO, mais préfère SUMO2/3. La déplétion de l'expression d'USPL1 ne provoque pas de changement détectable dans le profil global de sumoylation, ce qui suggère un nombre limité de cibles (Hickey et al., 2012).

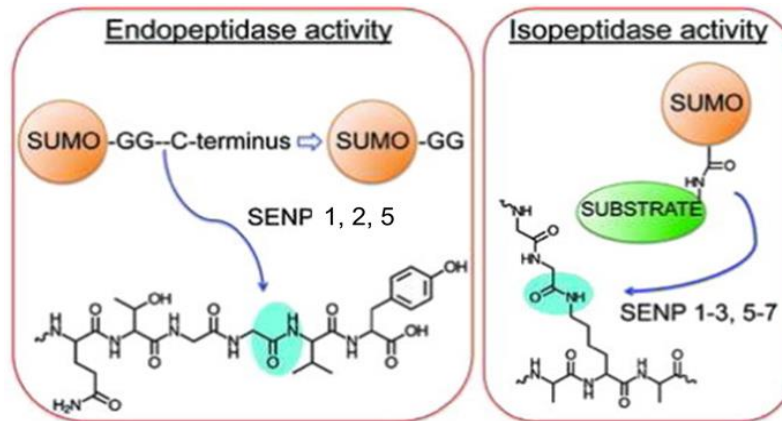


Figure 39 : Les Activités de sumoylation et désomoylation des SENPs. Les SENPs possèdent une activité d'endopeptidase permettant d'effectuer la maturation protéolytique au niveau du précurseur SUMO en C-terminal, pour exposer les deux résidus glycine. Les SENPs possèdent, également, une activité isopeptidase pour libérer SUMO conjugué aux protéines substrats (Kumar and Zhang, 2015).

3- Les relations entre la sumoylation et d'autres modifications des lysines

3.1- SUMO et l'ubiquitination

En termes de structure, une identité de 18% est retrouvée entre SUMO-1 et l'ubiquitine. En revanche, la position des deux résidus Gly C-terminaux, requis pour la formation de la liaison isopeptidique, est conservée entre l'ubiquitine et SUMO-1. L'ubiquitination est réalisée en cascade de 3 réactions, comme la sumoylation, grâce à l'action consécutive des enzymes d'activation (E1), des enzymes de conjugaison (E2) et des ligases (E3). L'ubiquitination est réversible grâce à l'action de déubiquitinasés capables d'éliminer ces modifications.

Il a été montré qu'un quart des lysines accepteurs de SUMO peuvent être modifiées par ubiquitination comme l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B- α , qui est sumoylé au même résidu lysine utilisé pour son ubiquitination. Cependant, I κ B- α sumoylé inhibe l'activité de NF- κ B alors que son ubiquitination l'oriente vers une dégradation par le protéasome (Desterro et al., 1998). Les modifications par sumoylation et ubiquitination peuvent se produire de façon séquentielle sur

la même lysine, telle que la sous-unité régulatrice d'Ikk, NEMO (NF- κ B Essential Modulator). La sumoylation de NEMO entraîne sa translocation et rétention dans le noyau. Après clivage de la fraction SUMO dans le noyau, le même résidu lysine pourrait être modifié par l'ubiquitine, ce qui entraîne son export vers le cytoplasme, où il peut interagir avec le complexe Ikk et les dimères NF- κ B (Huang et al., 2003).

La sumoylation et l'ubiquitination peuvent former des chaînes hybrides sur un même site lysine accepteur. Ces chaînes sont catalysées par un groupe spécifique d'ubiquitine ligase : STUbLs (SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases) qui ciblent, spécifiquement, les protéines sumoylées. SUMO peut, également, être modifié par l'ubiquitine, en K11, qui se trouve dans un site consensus de sumoylation. Les STUbLs possèdent un motif SIM et un domaine RING, qui leur permettent de lier, respectivement, les protéines sumoylées et les enzymes E2 de conjugaison de l'ubiquitine. Chez l'homme, RNF4 et RNF11 sont des STUbLs dont le substrat le plus étudié est PML, où les formes sumoylées sont orientées vers une ubiquitination donnant naissance à une chaîne hybride SUMO-ubiquitine, qui aboutit à une dégradation par le protéasome (Erker et al., 2013). Enfin, USP11 (Ubiquitin-Specific Protease 11) est capable de déubiquitiner les chaînes hybrides SUMO-ubiquitine produites par RNF4 (Hendriks et al., 2015).

3.2- SUMO et l'acétylation

Un certain nombre de protéines telles que les facteurs de transcriptions MEF2A (Myocyte Enhancer Factor 2A), Sp3, l'activateur transcriptionnelle p300 et le suppresseur de tumeur HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1) peuvent être modifiés par acétylation et sumoylation sur la même lysine. Il est à noter que ces deux modifications agissent de manière antagoniste par compétition pour la lysine cible. Pour exemple, SIRT1 induit la déacétylation de p300 (K1020, K1224) pour réprimer son activité transcriptionnelle. SENP3 inhibe la répression de p300, médiée par SIRT1, ce qui suggère que la sumoylation prend le relais sur les résidus lysine, récemment désacétylés, pour inhiber l'activité de p300 (Bouras et al., 2005).

4- Régulation de la transcription par SUMO

4.1- Régulation de l'activité des facteurs de transcription par SUMO

a- Interaction avec les régulateurs transcriptionnels

Plusieurs études ont révélé que les facteurs de transcription et les régulateurs de la chromatine sont des cibles potentielles de SUMO, qui s'avère posséder un effet inhibiteur sur la transcription. L'exemple le plus cité, montrant l'effet inhibiteur de SUMO sur la transcription, est celui de la sumoylation de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B- α , qui empêche sa dégradation et

entraîne la suppression de la transcription des gènes NF-kB-dépendante (Desterro et al., 1998). De même, la sumoylation peut transformer des activateurs en répresseurs, tel que p300, dont la sumoylation favorise l'interaction avec HDAC6 (Girdwood et al., 2003). La sumoylation du régulateur transcriptionnel KAP1 renforce sa capacité de répresseur transcriptionnel par recrutement d'HDAC1 et induction d'une structure hétérochromatinienne (Schultz et al., 2002). Le rôle de SUMO dans la promotion de l'activation transcriptionnelle est moins fréquent. Dans les lymphocytes T CD4+, la Sumoylation du facteur de transcription CTIP2 permet son interaction avec p300, et entraîne la dérégulation des gènes habituellement inhibés par CTIP2 (Dubuissez et al., 2016). Dans d'autres cas, la sumoylation favorise la transcription, non pas en recrutant des coactivateurs, mais en perturbant le recrutement ou l'assemblage de complexes répresseurs. Par exemple, HDAC3 peut supprimer l'activation des gènes médiée par TFII-I, qui lie l'élément initiateur de plusieurs promoteurs. La sumoylation de TFII-I altère son interaction avec HDAC3 (Tu et al., 2015), (figure 40). Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour comprendre comment les modifications par SUMO régulent de manière sélective le recrutement de corépresseur ou de coactivateurs.

b- Inhibition de l'acétylation et de la phosphorylation

En plus d'induire le recrutement de complexes régulateurs négatifs aux facteurs de transcription liés au DNA, SUMO peut entrer en compétition et inhiber d'autres types de modifications post-traductionnelles sur la lysine cible de ces facteurs. Pour exemple, l'acétylation d'HIC1 altère son association avec le composant MTA1 (Metastasis Associated) du complexe répresseur NuRD, réduisant son potentiel de répresseur de gènes. Cependant, la sumoylation du même résidu lysine par compétition avec l'acétylation restaure les fonctions répressives d'HIC1 (Rechem et al., 2010), (figure 40).

Bien que la sumoylation et la phosphorylation se produisent sur des résidus d'acides aminés différents, la sumoylation peut influencer l'état de phosphorylation des résidus voisins. Par exemple, STAT5, qui conduit la transcription des gènes requis au développement et aux fonctions de la cellule immunitaire, est sumoylé sur deux résidus voisins, K696 et K700. La sumoylation de STAT5 inhibe la phosphorylation à proximité de Y694, et entre en compétition avec l'acétylation de K696, empêchant ainsi deux modifications post-traductionnelles favorisant la transcription (Van Nguyen et al., 2012). Comme mentionné précédemment, STAT5 sous sa forme phosphorylée est capable d'augmenter la transcription du VIH-1 par liaison aux sites NF-kB du promoteur LTR et de réactiver le VIH-1 latent. Il est démontré que des traitements à base de benzotriazoles bloquent la sumoylation de STAT5 phosphorylée, augmentant l'activité de STAT5 et son occupation du LTR du VIH-1. Ainsi, les benzotriazoles,

sont capables de réactiver le VIH-1 latent et peuvent agir comme de potentielles LRAs où la sumoylation de STAT5 serait une cible pour les stratégies d'éradication du VIH-1 (Bosque et al., 2017).

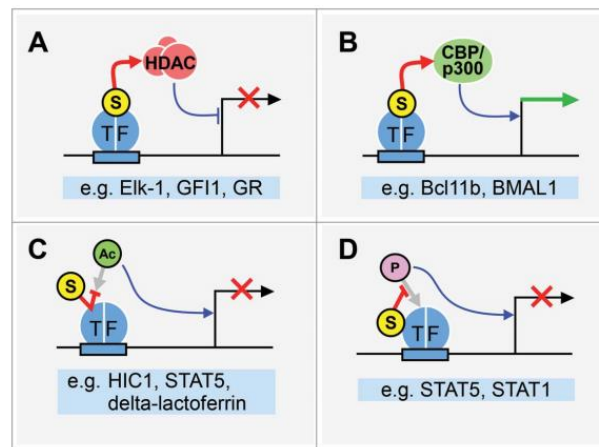


Figure 40 : SUMO contrôle l'activité des facteurs de transcription selon divers mécanismes. (A) La sumoylation des facteurs de transcription renforce l'inhibition de la transcription, en recrutant des HDAC. (B) La sumoylation de certains facteurs de transcription entraîne le recrutement de coactivateurs (p300), qui stimulent la transcription. (C) SUMO entre en compétition avec l'acétylation de la lysine du facteur cible, ce qui réprime la transcription. (D) SUMO peut interférer avec la phosphorylation de résidus voisins, pour bloquer l'activité des facteurs de transcription (Rosonina et al., 2017).

c- Association à la chromatine

En plus de réguler l'activité des facteurs de transcription par interactions avec des régulateurs transcriptionnels ou par compétition avec d'autres modifications post-traductionnelles, la sumoylation contrôle, à travers divers mécanismes, l'association des facteurs de transcription à la chromatine.

- Les STUbLs entraînent l'ubiquitination des cibles polysumoylées et entraîne leur dégradation (Sp1). Dans d'autres cas, la sumoylation interfère avec l'ubiquitination, empêchant ainsi la dégradation (IκB-α).
- La sumoylation peut avoir des effets directs, en inhibant (Sp1) ou favorisant (PAX6 : Paired Box 6) la liaison des facteurs de transcription à la chromatine
- La localisation cellulaire cytoplasmique ou nucléaire des facteurs de transcription peut être, également, modulée par sumoylation. Par exemple, ZIC3 (Zic Family Member 3) est un répresseur transcriptionnel requis au développement normal du cœur dont la sumoylation est associée à sa rétention nucléaire (pour revue (Rosonina et al., 2017)).

4.2- Sumoylation des histones

La modification des histones par SUMO permet de moduler la dynamique de la chromatine et semble jouer un rôle répressif dans la transcription. Chez les mammifères, la sumoylation a été

détectée, principalement, sur l'histone H4, mais est, également, retrouvée sur les quatre types d'histones. L'histone H3 a été trouvée modifiée par SUMO sur la lysine 19. Étonnamment, le traitement par la trichostatine A (HDACi) augmente la sumoylation de l'histone H3, et, inversement, l'inhibition des HAT (curcumin) réduit cette sumoylation. La sumoylation de H4 augmente son interaction avec HDAC1 et HP1, ce qui évoque un rôle répressif de la sumoylation des histones. Cependant, SUMO a, aussi, été retrouvé sur des histones H4 acétylées (lysines 5, 8, 12, 16). De plus, la surexpression de p300 augmente la sumoylation d'H4. Bien que ces modifications d'histones semblent contradictoires, il est possible que la sumoylation prenne le dessus sur les effets de l'acétylation (pour revue (Wotton et al., 2017)). D'autres travaux ont examiné la compaction de la chromatine en présence de nucléosomes modifiés par SUMO3 sur H4K12. Cette modification s'est révélée inhiber la compaction des nucléosomes, en empêchant les interactions internucléosomales, et semble favoriser l'accessibilité de la chromatine. Cependant, il convient de noter que ce travail a été effectué avec des nucléosomes uniformément modifiés et qu'*in vivo* cette modification serait plus sporadique (Dhall et al., 2014). Ainsi, il est possible que la sumoylation des histones joue des rôles différents sur des locus différents ou dans des contextes physiologiques différents. Globalement, notre compréhension de la sumoylation des histones reste limitée. Davantage d'investigations permettront de comprendre l'impact de la sumoylation sur la fonction des histones et le remodelage de la chromatine.

4.3- Sumoylation des facteurs de remodelage de la chromatine

L'impact majeur de la sumoylation sur la modification des histones est, principalement, lié à sa capacité de réguler les complexes associés à la chromatine, et peut conditionner la façon dont les marques d'histones sont déposées.

a- Impact de la sumoylation sur les facteurs de méthylation des histones

L'histone méthyltransférase SETDB1, avec son domaine SIM, est recrutée par le corépresseur KAP-1 sumoylé qui lie à la chromatine par l'intermédiaire de protéines en doigt de zinc KRAB (cette partie sera développée ci-après) (Ivanov et al., 2007). Un autre exemple, la SUMO ligase PIAS1 a été impliquée dans la méthylation du DNA, l'induction de la marque H3K9me et le recrutement d'HP1, conférant un état répressif au locus *Foxp3*, ce qui limite la différenciation des cellules T régulatrices naturelles dérivées du thymus (Liu et al., 2010).

b- Impact de la sumoylation sur la déméthylation des histones

Comme mentionné précédemment, LSD1 entraîne la répression des gènes par déméthylation des groupes mono ou di-méthyle-H3K4, et fonctionne par coopération avec CoREST1. Il a été

démontré que le complexe CoREST entraîne la répression SUMO-dépendante des gènes neurones spécifiques dans des cellules non neuronales. Cette répression dépendante de Sumo2/3 est médiée par le SIM retrouvé dans CoREST (Ouyang et al., 2009). Dans une autre étude, il est montré que la sumoylation de la sous-unité BRAF35 du complexe LSD1/CoREST, est nécessaire au maintien de la répression complète des gènes spécifiques aux neurones, régulant ainsi la différenciation neuronale (Ceballos-Chávez et al., 2012).

c- Impact de la sumoylation sur la déacétylation des histones

NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylation) fait partie des complexes impliqués dans le recrutement des HDACs à la chromatine, et dont le composant de base est l'enzyme de remodelage des nucléosomes CHD3 (Chromodomain Helicase DNA-binding). Cette enzyme est capable d'interagir avec KAP1 sumoylé, afin d'entraîner l'extinction de l'expression génique (Ivanov et al., 2007). Le complexe NuRD contient d'autres sous-unités protéiques de liaison aux histones telles que RbAp46/48 (retinoblastoma binding protein 46/48) et p66, des protéines de liaison au DNA méthylé comme MBD2/3 et MTA. Ces sous-unités ont la capacité d'être sumoylées ou contiennent des SIMs leur permettant de renforcer les interactions au sein du complexe NuRD (Mario, 2013). La sumoylation module les HDACs de différentes façons. Comme mentionné, précédemment, la sumoylation de certains co-activateurs transcriptionnels tels que ELK-1 et p300 entraîne, respectivement, le recrutement d'HDAC2 et HDAC6 ou SIRT1. Inversement, peu de cas de déplacements des HDACs par SUMO sont rapportés. On notera que la sumoylation de DNMT3A altère le recrutement d'HDAC1/2 (Mario, 2013).

D'autre part, les HDACs peuvent être modulés par sumoylation. HDAC1 est sumoylé sur les lysines K444 et K476 de son extrémité C-terminale, afin de renforcer son activité de répresseur transcriptionnel (David et al., 2002). Cependant, dans un travail plus récent, il a été démontré qu'HDAC1 peut être modifié soit par SUMO1 ou SUMO2, qui ont la capacité d'en modifier la stabilité. La modification par SUMO1 favorise l'ubiquitination et la dégradation d'HDAC1, alors que la modification par SUMO2 améliore sa stabilité dans les cellules cancéreuses du sein (Citro et al., 2013). HDAC4 est, également, modifié par Sumo2 sur la K559, qui est importante dans la répression de l'expression des gènes par déacétylation (Wotton et al., 2017).

5- La sumoylation à l'interface hôte-virus

Au cours de l'infection et de la réplication, les virus peuvent manipuler le processus de sumoylation pour assurer leur persistance au sein de l'hôte. Par inhibition ou induction de la sumoylation des protéines, les virus ont une multitude de mécanismes par lesquels ils manipulent ce processus cellulaire pour assurer leur survie et leur propagation.

a- Virus et niveau d'expression de SUMO

A l'heure actuelle, seul le promoteur de SUMO-1 est identifié avec ses sites de liaison à NF- κ B, FOXP3 et p53. Certaines données suggèrent que le promoteur SUMO-1 est activé par la protéine virale LMP1 (Latent Membrane Protein 1) au cours de la latence de l'EBV. LMP1 entraînerait une augmentation des pools intracellulaires de SUMO et une augmentation de la sumoylation des protéines (Lowrey et al., 2017).

Dans un autre sens, les traitements à l'IFN- α augmentent les niveaux de SUMO-1 non conjugué, sans modifier leur mRNA. Cette augmentation des niveaux de SUMO est décrite pour inhiber la réplication du HSV et du VIH, mettant en évidence un mécanisme par lequel le processus de sumoylation contribue à l'effet antiviral des interférons (Sahin et al., 2014), (figure 41). Le virus de la grippe augmente les niveaux de SUMO sans modifier leur mRNA. Il tire profit de cette accumulation des protéines SUMO pour sa réplication. Il est suggéré qu'il se produit un échange de SUMO-1/2/3 à partir de cibles préexistantes vers un ensemble restreint de nouvelles cibles. Cependant, les mécanismes exacts de régulation de SUMO, par ce virus, ne sont pas encore déterminés (Domingues et al., 2015).

b- Sumoylation et échappement viral à la réponse immune

SUMO est associé à la formation et aux fonctions des structures nucléaires riches en protéines sumoylées, connues sous le nom de PML nuclear bodies (PML NBs). Ces PML NBs comprennent PML, Sp100, DAXX (Death Associated protein), les trois isoformes de SUMO, ainsi que de nombreuses autres protéines associées de façon permanente ou transitoire. PML constitue l'élément clé de ces NBs. La sumoylation est essentielle à leur intégrité, en favorisant les interactions SUMO-SIMs entre les différentes protéines qui les composent, créant ainsi, un centre de sumoylation caractérisé par une forte activité SUMO. Par ailleurs, les PML NBs régulent plusieurs activités telles que l'expression des gènes, la suppression des tumeurs, l'apoptose, la modification et l'assemblage de la chromatine et les réponses immunes anti-virales. En effet, les PML NBs semblent être impliqués en aval de l'action antivirale de l'IFN, qui induit la transcription des gènes codant pour les composants majeurs de ce complexe. Au cours des infections virales, les modifications par SUMO et les interactions SUMO-SIM jouent un rôle clé dans la régulation de l'immunité antivirale et dans le recrutement de facteurs de restrictions associés aux PML NBs au niveau des domaines nucléaires contenant les génomes viraux (Everett and Chelbi-Alix, 2007; Gärtner and Muller, 2014). Ainsi, le ciblage des PML NBs pourrait être une stratégie virale efficace pour échapper à la réponse à l'IFN. Cependant, les virus ont développé des mécanismes, pour faire face aux défenses cellulaires par déstabilisation des PML NBs. Le moyen rapide d'atteindre cet objectif est de détourner la voie

de sumoylation. Les virus sont capables de provoquer diverses modifications des PML NBs durant l'infection, allant de la dispersion des PML NBs par HCMV (Human Cytomegalovirus) et VZV (Varicella Zoster Virus) à la dégradation protéasomale des composants du PML NBs par HSV-1 (Herpes Simplex Virus type 1) et KSHV (Kaposi's Sarcoma-associated Herpes Virus) (Scherer and Stamminger, 2016).

Dans le cas du VIH-1, une relocalisation temporaire de PML dans le cytoplasme a été observée durant les premières heures suivant l'infection (Kahle et al., 2015). Lusic *et al.*, ont constaté que PML colocalise avec le provirus intégré et se lie au promoteur du VIH-1 latent (Lusic et al., 2013). Cependant, une étude a montré que l'effet anti-VIH-1 de PML était de type cellulaire dépendant, principalement retrouvé dans les fibroblastes, mais absent des lignées myéloïdes et Lymphocytaires T (Kahle et al., 2015).

Enfin, pour échapper à la réponse immunitaire, la protéine VP35 du virus Ebola inhibe la transcription de l'IFN suite à la sumoylation d'IRF7 (Interferon Regulatory Factor 7). VP35 forme un complexe entre la SUMO E3 ligase, PIAS1 et IRF7, afin d'augmenter la sumoylation d'IRF7 (Chang et al., 2009b).

c- *Virus et enzymes d'activation de SUMO (SAE1/2)*

Les virus ont, également, développé des mécanismes par lesquels ils peuvent inhiber la formation de l'intermédiaire E1-SUMO. Par exemple, la protéine virale Gam1 de l'adénovirus aviaire CELO (Chicken Embryo Lethal Orphan) recrute une ubiquitine ligase afin d'induire la dégradation de SAE1 et SAE2 par le protéasome. Ce mécanisme a pour résultat final, l'accumulation de substrats non modifiés par SUMO, une localisation accrue de SUMO-1 dans le cytoplasme et la destruction des corps nucléaires PML, contribuant tous à une meilleure propagation virale (Boggio et al., 2007), (figure 41).

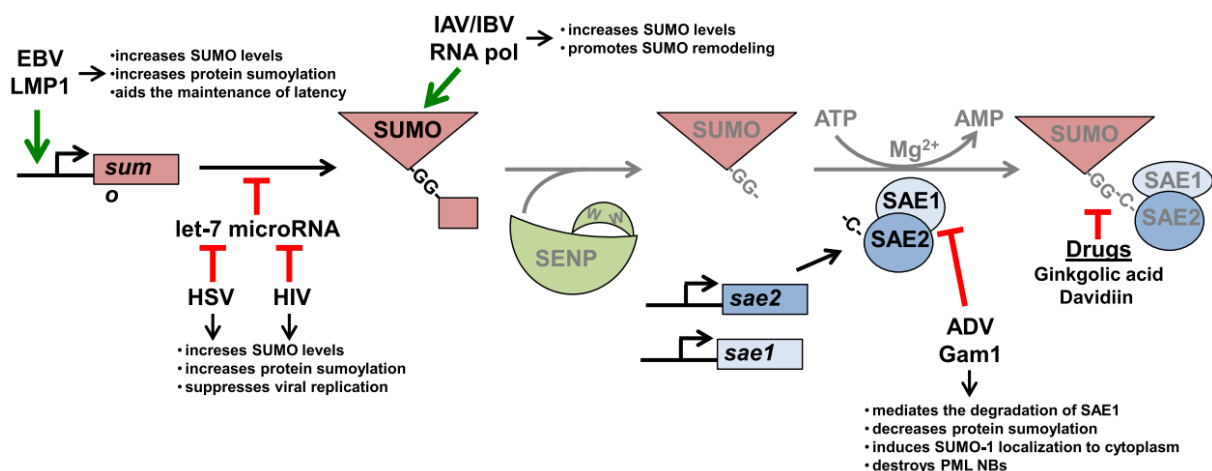


Figure 41 : Les virus ciblant SUMO et les SAE 1/2 (Lowrey et al., 2017).

d- Virus et UBC9

Afin de promouvoir l'infection, les virus sont capables de manipuler UBC9 par interactions directes, dégradation ou relocalisation. Certaines protéines virales telles que E1A de l'adénovirus humain et LMP1 d'EBV, interagissent avec l'extrémité N-terminale d'UBC9. Elles aboutissent, respectivement, soit à l'inhibition de la sumoylation des protéines cellulaires cibles ou à son augmentation afin de maintenir la latence virale et le potentiel oncogène de LMP1. A l'inverse, la sumoylation de la protéine E2 du papillomavirus, suite à son interaction avec UBC9, a un effet inhibiteur sur le promoteur viral ou activateur sur certains promoteurs cellulaires (Lowrey et al., 2017).

UBC9 interagit avec Gag et joue un rôle important dans l'assemblage du VIH-1 et la production de particules infectieuses. La déplétion d'UBC9 entraîne la production de virions défectueux par diminution d'incorporation d'Env. Elle est liée à une dégradation d'Env par la voie lysosomale. Une réduction des niveaux de Gag et Env à la membrane plasmique a, également, été retrouvée. Ces effets ne seraient pas liés à l'activité enzymatique d'UBC9, mais à un défaut de transfert de Gag et Env à la membrane plasmique (Bohl et al., 2013; Jaber et al., 2009).

Certains virus entraînent la dégradation d'UBC9 par le protéasome telles que la protéine E6 d'HPV et Gam1 de l'adénovirus aviaire. Le résultat final respectif aboutit à la modulation de la sumoylation dans la cellule hôte ou l'activation de la transcription et la réplication virale (Lowrey et al., 2017), (figure 42).

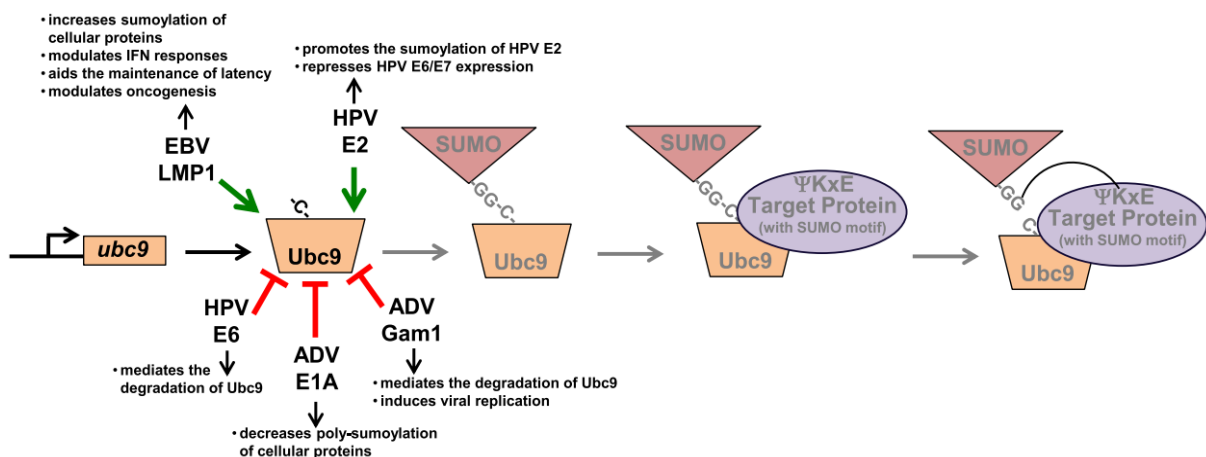


Figure 42 : Les virus ciblant UBC9 (Lowrey et al., 2017).

e- Virus et SUMO E3 ligases

- Les virus modulant l'activité des SUMO E3 ligases

Les niveaux d'expression des SUMO E3 ligases, en particulier les membres de la famille PIAS, sont augmentés par certaines infections virales dues à l'HSV-1 et au Parvovirus B19. Elles ont pour but de réguler la réplication virale, la pathogenèse et les réponses immunitaires antivirales.

Comme mentionné plus haut, l'infection par le virus Ebola augmente l'activité de la SUMO E3 ligase PIAS1, entraînant la sumoylation du facteur régulateur de l'interféron (IRF7) et la répression de la transcription de l'IFN.

A l'opposé, d'autres virus, comme l'HPV et le CMV, inhibent l'activité des SUMO E3 ligases, aboutissant, respectivement, au renforcement de son rôle dans l'oncogenèse ou à la répression des gènes stimulés par l'interféron (Wilson, 2012).

- Les virus mimant les SUMO E3 ligases

KSHV code pour le répresseur K-bZIP (open reading frame K8 spliced to adjoin the ZIP domain), qui possède une activité SUMO E3 ligase spécifique de SUMO-2/3, capable d'induire sa propre sumoylation mais aussi celles de protéines cibles. Elle aboutit, finalement, à l'inhibition de l'activation des interférons de type I et à la régulation de la réactivation et du cycle lytique du KSHV. Les adénovirus codent, également, pour une SUMO E3 ligase E1B-55K, qui induit la sumoylation de p53, suivie par son inactivation et son export du noyau pour être dégradée par le protéasome (Adorisio et al., 2017).

Il existe, également, des exemples de protéines virales du HSV-1 et KSHV, qui agissent comme des STUbLs, afin d'induire l'ubiquitination et la dégradation de protéines cellulaires sumoylées, comme celles des PML NBs (Mattoscio et al., 2013).

f- Virus et SENPs

Les SUMO protéases peuvent être des cibles idéales pour la régulation de l'infection et la réplication virale. Récemment, de nouvelles classes d'inhibiteurs de SENPs ont montré leur efficacité dans l'inhibition de la réplication du VIH-1. Ces inhibiteurs n'affectent pas la production virale, mais conduisent à la génération de virus incapables de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. Ainsi, les virus provenant de cellules traitées aux inhibiteurs de SENPs présentent des intégrases modifiées par SUMO, avec une moindre capacité d'intégration (Madu et al., 2015). Certains virus comme EBV et le virus de la vaccine sont capables, soit d'inhiber les SENPs ou de coder pour des protéines mimant leur activité (Lowrey et al., 2017).

Le répresseur transcriptionnel KAP1

KAP1 (KRAB (Krüppel-Associated Box) domain-Associated Protein 1), également connue sous le nom de TRIM28 (Tripartite Motif-containing protein 28) ou de TIF1 β (Transcriptional Intermediary Factor 1 beta), a été identifié en 1996 en tant que partenaire d'interaction des membres de la famille des facteurs de transcription KRAB-ZFPs (Krüppel-Associated Box Zinc Finger Proteins). KAP1 est membre d'une famille d'environ 60 gènes *trim* humains et partage de nombreuses caractéristiques structurales avec trois autres protéines TRIM : TRIM24 (TIF1 α), TRIM33 (TIF1 γ), et TRIM66 (TIF1 δ). KAP1 est important pour la régulation de multiples phénomènes physiologique, comme le développement et la différenciation cellulaire, la réponse aux dommages de DNA, la réplication virale, la réponse immunitaire et la tumorigenèse. KAP1 est exprimé de façon ubiquitaire tout au long du développement, avec une très forte expression dans les cellules souches embryonnaires et plusieurs types de tumeurs. Plusieurs rapports ont révélé une corrélation positive entre le niveau d'expression de KAP1 et le pronostic du cancer. La régulation positive des gènes *kap1* dans les tissus tumoraux de cancer gastrique, ovariens, gliomes et seins est associée à un mauvais pronostic. La surexpression du gène *kap1* a été détectée dans le sang périphérique de patients atteints de cancer gastrique. Ainsi, KAP1 pourrait servir de biomarqueur prédictif du stade évolutif du cancer (Czerwińska et al., 2017). Le rôle de KAP1 dans les cellules cancéreuses a, très souvent, été remis en question. KAP1 peut servir de facteur pro-tumorigène permettant la survie des cellules cancéreuses. Sa forte expression régulerait négativement l'expression de p53, des gènes pro-apoptotiques : *tp53aip1*, *bax*, *bbc3* et *pmaip1* et faciliterait la progression épithélial vers un phénotype mésenchymal (Czerwińska et al., 2017).

1- Structure de KAP1

KAP1 est une protéine de 110 kDa, qui contient un domaine RBCC (RING finger, 2 B-box zinc fingers, Coiled-Coil region) N-terminal. Ce domaine lui permet d'être recruté au DNA, grâce à l'interaction avec le domaine répresseur KRAB, présent chez un très grand nombre de facteurs de transcription KRAB-ZFP. RBCC est composé de trois sous-domaines : un domaine RING, de deux domaines nommés B-boxes et un domaine coiled-coil (CC). Bien que tous les membres de la famille TIF1 contiennent un domaine RBCC, seul KAP1 peut se lier aux KRAB des KRAB-ZFP (Iyengar et al., 2011; Peng et al., 2000). Le domaine TSS (TIF1 signature sequence), adjacent au RBCC, est requis pour l'activité de répression transcriptionnelle de TRIM33. Cependant, la fonction de TSS dans KAP1 n'a pas encore été définie (Venturini et

al., 1999). Le pentapeptide PxVxL, hydrophobe, situé dans la région centrale de KAP1, entre les acides aminés 483 et 510 est impliqué dans l'interaction avec les protéines HP1, qui par la suite peuvent se lier à H3K9me3. Ce domaine, nommé HP1BD (HP1 Binding Domain), est nécessaire à la rétention nucléaire de KAP1. Ce complexe KAP1-HP1 joue un rôle critique dans le maintien de l'hétérochromatine et l'inactivation de l'expression génique. Cependant, le mécanisme détaillant le recrutement de KAP1 à HP1 sur l'hétérochromatine reste à élucider (Lechner et al., 2000; Riclet et al., 2009). Les études d'immunofluorescence montrent que la majorité de KAP1 présente la même localisation que HP1 γ , qui est présent dans tout le nucléoplasme, mais exclu des nucléoles. Un faible pourcentage de KAP1 est retrouvé dans des structures nommées « dot-like », qui sont des régions d'hétérochromatine péricentrique. Un pourcentage, encore plus faible, est trouvé dans les régions occupées par HP1 β , localisées dans les foyers hétérochromatiques et les nucléoles (Ryan et al., 1999).

A l'extrémité C-terminale de KAP1, sont retrouvés les domaines PHD (Plant Homeo Domain) et Bromo. Ce dernier recrute SETDB1 et un composant du complexe NuRD : CHD3, afin de condenser la chromatine et entraîner l'extinction des gènes (Iyengar and Farnham, 2011). Il a été démontré que l'ajout d'inhibiteur d'HDAC n'inverse que partiellement la répression des gènes médiée par KAP1. Comme, seule une petite fraction de KAP1 s'associe de manière stable à CHD3 *in vivo*, cette dernière ne jouerait, donc, qu'un rôle mineur dans l'effet répresseur de KAP1 (Schultz et al., 2001a). En revanche, la marque H3K9me3, induite par SETDB1, crée des sites de liaisons génomiques de haute affinité pour le complexe KAP1-HP1. De plus, la colocalisation de KAP1 et SETDB1 à des milliers de sites génomiques dans le génome humain, suggère que SETDB1 jouerait un rôle important dans la répression médiée par KAP1 (Frieze et al., 2010; Mascle et al., 2007; Schultz et al., 2002), (figure 43).

2- Les modifications post-traductionnelles de KAP1

L'extrémité C-terminale de KAP1 est soumise à plusieurs types de modifications post-traductionnelles. KAP1 est sumoylé à six lysines 554, 575, 676, 750, 779 et 804, présentes ou adjacentes aux domaines PHD et Bromo (Zeng et al., 2008). L'état de sumoylation de KAP1 est modifié par les SUMO protéases SENP1, SENP7 et par l'état de phosphorylation de la sérine-824 de KAP1 (Garvin et al., 2013; Li et al., 2007b). Les sérines 824 et 473 de KAP1 sont, principalement, phosphorylées par ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated). Les kinases PIKKs (Phosphoinositide 3 Kinase-like protein Kinases), ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) et la DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit) interviennent en cas de carence d'ATM. Les phosphorylations des sérines 824 et 473 sont cruciales dans les

réponses aux dommages de DNA (Hu et al., 2012). La phosphorylation sur la Sérine 824 conduit à la perte des résidus SUMO sur KAP1, à la dissociation des complexes répresseurs NuRD et SETDB1 et au relâchement de la chromatine, permettant la réparation de DNA. La phosphorylation de la Sérine 473 est, également, associée à une inhibition de la liaison KAP1-HP1 (Li et al., 2007b). ATM induit ces 2 phosphorylations de KAP1, entraînant l'activation des protéines Chk1 et Chk2 (Checkpoint Kinase 1, 2), qui sont responsables de l'arrêt du cycle cellulaire en cas de dommage de DNA. Cependant, contrairement à la phosphorylation de la sérine 824, KAP1 phosphorylé à la sérine 473 est localisé de manière diffuse dans le noyau, au lieu de s'accumuler en foyers aux sites de dommages (White et al., 2012). Ces réponses aux dommages de DNA sont impactées par la phosphatase PP1, qui interagit avec la région coiled-coil de KAP1 afin, de déphosphoryler la sérine 824. La PP4 induit la déphosphorylation à la fois des sérines 824 et 473. Il est, également, démontré que la phosphorylation de la Sérine 473 de KAP1 possède un rôle supplémentaire associé à la réponse immunitaire. KAP1 est phosphorylé à la sérine 473 mais pas à la sérine 824, lors de l'activation du récepteur des lymphocytes T (Chikuma et al., 2012). Ainsi, une exploration plus approfondie du rôle de la phosphorylation de la sérine 473 de KAP1 dans les réponses immunitaires, induites par les infections virales comme celle du VIH-1, pourrait être enrichissante.

Les tyrosines 449, 458 et 517 de KAP1 sont phosphorylées par des kinases de la famille Src (SFKs : Src family kinases). La phosphorylation de ces tyrosines interfère sur l'interaction entre KAP1 et HP1. Comme les SFKs sont impliquées dans la régulation des processus oncogènes, y compris la croissance et la différenciation cellulaire, KAP1 serait, donc, impliqué dans la transformation oncogénique médiée par SFK (Kubota et al., 2013). Enfin, il a été démontré que KAP1 est acétylé et ses niveaux d'acétylation sont régulés négativement par HDAC10 et SIRT1. La déacétylation de KAP1 sur les lysines 266, 377, 469, et 770 et facilite la réparation aux dommages de DNA (Lai et al., 2010; Lin et al., 2015).

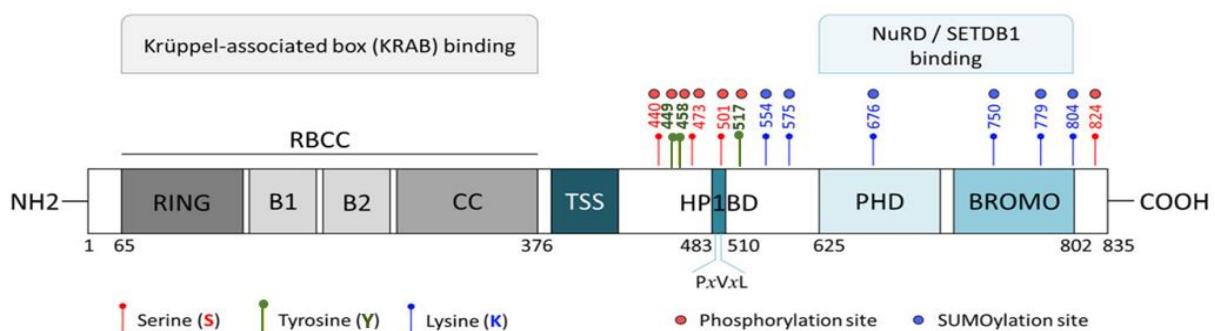


Figure 43 : La structure et les modifications post-traductionnelles de KAP1 (Czerwińska et al., 2017).

3- Recrutement génique de KAP1 et régulation transcriptionnelle

KAP1 régule la transcription à travers divers mécanismes en fonction de ses modifications post-traductionnelles et de sa liaison à de multiples partenaires, (figure 44). Récemment, KAP1 a été retrouvé capable d'interagir avec l'hélicase SMARCAD1 (SWI/SNF-related, Matrix-associated Actin-dependent Regulator of Chromatin, subfamily A, containing DEAD/H Box 1) par son domaine RBCC. SMARCAD1 possède une activité de remodelage des nucléosomes, essentielle à la réparation de DNA et au maintien de la structure hétérochromatinienne, après réplication du DNA. KAP1 est responsable de la rétention nucléaire de SMARCAD1 qui lie les gènes cibles de KAP1 (Ding et al., 2018).

KAP1 est associé à la fois à l'hétérochromatine et à l'euchromatine. KAP1 induit la formation d'hétérochromatine et stimule sa propagation grâce à sa colocalisation avec HP1 dans les domaines d'hétérochromatine péricentriques. Les gènes les plus susceptibles à ce phénomène d'inhibition par KAP1 sont principalement localisés dans des régions du génome à forte activité génique. Plus précisément, cette répression est plus efficace aux promoteurs et aux régions intragéniques à forte activité transcriptionnelle et contenant des niveaux élevés de marques répressives d'histone (Meylan et al., 2011).

KAP1 est essentielle aux protéines KRAB-ZNF dans l'exercice de leur potentiel répressif. Cette vaste famille de facteurs de transcription régule divers processus tels que le développement embryonnaire, l'expression génique tissu-spécifique et la progression du cancer. Les protéines KRAB-ZNF se lient à des motifs de reconnaissance du DNA par l'intermédiaire de leurs domaines en doigts de zinc, et recrutent KAP1 par son domaine RBCC (Groner et al., 2010). Initialement, ZNF10 a été décrite comme la première KRAB-ZFP par l'intermédiaire de laquelle KAP1 exerce ses effets de répresseur transcriptionnel. ZBRK1 a, ensuite, été identifiée pour recruter KAP1 et supprimer l'expression de p21. Du fait de sa liaison avec KAP1, ZNF160 supprime TLR4 dans les cellules épithéliales intestinales, afin de permettre la tolérance immunitaire aux bactéries commensales (Cheng et al., 2014).

La sumoylation de KAP1 sur son domaine Bromo renforce les marques de déacétylation et H3K9me3, à la suite du recrutement de NuRD et SETDB1, ce qui sert au maintien de la structure hétérochromatinienne et à la répression des gènes (Ivanov et al., 2007). La liaison d'HP1 à KAP1 stabilise les interactions KRAB-ZNF-KAP1 et l'inactivation transcriptionnelle (Sripathy et al., 2006).

KAP1 interfère, également, sur l'interaction entre NF- κ B et p300, réduisant le niveau d'acétylation de NF- κ B et son activité transcriptionnelle (Kamitani et al., 2011).

A l'inverse, KAP1 peut, également, participer à une activation transcriptionnelle. Comme mentionné précédemment, les dommages au DNA sont capables d'induire la phosphorylation des sérines 473 et 824 réduisant les marques répressives de di- et tri-méthylation de H3K9 et augmentant l'acétylation de H3K14. Il en résulte un relâchement de la chromatine et une activation des gènes pro-apoptotiques et de régulation du cycle cellulaire : p21, Gadd45 α , Bax, Noxa et Puma (Lee et al., 2007a; Li et al., 2007b).

Le rôle de KAP1 dans la régulation de la méthylation du DNA a été mis en évidence dans une étude montrant sa capacité à lier des DNA méthyl transférase tels qu'UHRF1. KAP1 sert d'intermédiaire de liaison entre ZFP57, un régulateur transcriptionnel, requis pour le maintien de l'empreinte génique et UHRF1 (Quenneville et al., 2011).

Récemment, un nouveau rôle de KAP1 dans le contrôle de l'élongation transcriptionnelle a été identifié. KAP1 stabilise la mise en pause de la RNA Pol II près du site d'initiation de la transcription dans de nombreux gènes inactifs, permettant l'accumulation de la Pol II, afin de préparer l'induction de ces gènes. La mise en pause de la Pol II dépend de l'état de phosphorylation de KAP1. Lorsque la S824 de KAP1 est phosphorylée, il y a libération de la Pol II ce qui entraîne une transcription rapide des gènes cibles (Bunch et al., 2014).

4- Activité enzymatique de KAP1

KAP1 possède une activité de SUMO E3 ligase par son domaine PHD, qui est capable de recruter l'enzyme de conjugaison UBC9. Le domaine PHD est capable d'induire la sumoylation du domaine Bromo qui va ensuite interagir avec les complexes répresseurs NuRD et SETDB1 et induire la forme répressive de KAP1 (Ivanov et al., 2007), (figure 44).

Le domaine RING de KAP1 possède une activité de SUMO E3 ligase. Les deux principaux substrats sumoylés par KAP1 sont : IRF7 qui est le facteur de transcription régulateur des réponses immunitaires dépendantes de l'IFN de type I et Vps34 qui est crucial pour la formation de l'autophagosome. La sumoylation de Vps34 déclenche la formation d'autophagosomes. La sumoylation d'IRF7 par le domaine RING de KAP1 réduit son activité de transcriptionnelle et supprime les réponses antivirales à l'IFN. IRF7 est jusqu'à présent le seul facteur de transcription identifié comme cible de sumoylation par KAP1 (Liang et al., 2011; Yang et al., 2013b).

Le domaine RING de KAP1 a, également, une activité d'ubiquitine E3 ligase. Des études ont démontré que KAP1, en présence de MAGE, entraîne l'ubiquitination de p53 et ZNF382 pour faciliter leur dégradation (Doyle et al., 2010; Xiao et al., 2011). Il a été d'abord démontré que KAP1 forme un complexe avec MDM2, qui est une ubiquitine E3 ligase favorisant sa propre

ubiquitination, celle de p53, et de plusieurs autres protéines cellulaires. L'ensemble MDM2 et KAP1 stimule la formation du complexe p53-HDAC1 et inhibe l'acétylation de p53. L'acétylation et l'ubiquitination de p53 utilisent les mêmes résidus lysines, et sont des événements, mutuellement, exclusifs. KAP1 et MDM2 contribuent à la régulation fonctionnelle de p53, d'abord par l'inhibition de son acétylation, puis par son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Wang et al., 2005).

La formation du complexe KAP1-MDM2-p53 est renforcée par les protéines MAGE de classe I, qui sont fortement exprimées dans divers cancers (Brown et al., 2009). Les protéines MAGE associées à KAP1 favorisent, activement, la survie tumorale en facilitant la suppression de l'activité de p53. Plus tard, il a été démontré que les protéines MAGE améliorent l'activité ubiquitine ligase du domaine RING de KAP1, qui peut ubiquitiner et orienter p53 vers une dégradation par le protéasome, indépendamment de MDM2 (Doyle et al., 2010).

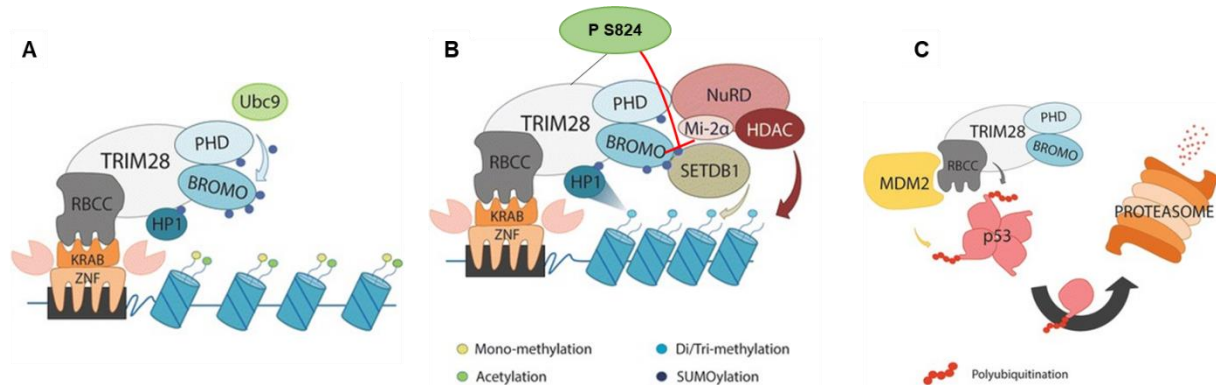


Figure 44 : Les activités enzymatiques de KAP1 et son recrutement génique par les facteurs de transcription KRAB-ZNF. (A) KAP1 induit la répression des gènes par condensation de la chromatine, grâce à sa liaison aux protéines KRAB-ZNF par son domaine RBCC. KAP1 catalyse la sumoylation de son domaine Bromo par PHD, suite à l'interaction de la cystéine 651 de KAP1 avec UBC9. (B) KAP1 sumoylé recrute les complexes SETDB1 et NuRD conduisant à la création des marques H3K9me3 et à la déacétylation des histones. La liaison à HP1 stabilise le complexe KAP1 lié aux KRAB-ZNF. La phosphorylation de la S824 de KAP1 mène à une perte des résidus SUMO, des complexes NuRD et SETDB1 conduisant au relâchement de la chromatine. (C) KAP1 possède une activité E3 ubiquitine ligase (domaine RING) et dirige p53 vers une dégradation par le protéasome ((Czerwińska et al., 2017) avec modifications).

5- Implication de KAP1 dans la latence virale

KAP1 joue un rôle important dans la répression épigénétique des rétrovirus endogènes, et ces mêmes mécanismes sont impliqués dans la répression d'un certain nombre de virus latents, non endogènes (Groh and Schotta, 2017).

KAP1 inhibe l'intégration du VIH-1 par liaison à l'intégrase et l'induction de sa désacétylation par formation d'un complexe protéique comprenant HDAC1 (Allouch et al., 2011). Au niveau transcriptionnel, des travaux ont montré que ZNF10 réprime fortement et en conjonction avec

KAP1, SETDB1 et HP1 γ , la transcription LTR du VIH-1. Il est à préciser, que seuls les effets directs de ZNF10 sur l'activité transcriptionnelle du LTR ont été étudiés. Le lien entre ZNF10, KAP1, SETDB1 et HP1 γ dans la répression du LTR n'ont été démontrés que de façon indirecte, en observant une diminution de l'activité répressive de ZNF10, après le knock-down de KAP1, SETDB1 et HP1 (Nishitsuji et al., 2015). Une étude similaire, montrant la capacité de ZBRK1 à inhiber la transcription LTR du VIH-1 a été réalisée. Bien que les expériences de ChIPs aient montré le recrutement de KAP1 au promoteur viral, le knock-down de ZBRK1 n'a pas induit de changement significatif de liaison de KAP1 au LTR (Nishitsuji et al., 2012). Ainsi, aucune étude n'a, à ce jour, montré l'implication directe de KAP1 dans l'inhibition de la transcription et l'établissement de la latence du VIH-1.

KAP1 recrute les complexe 7SK snRNP sur la plupart des gènes contenant les RNA polymérase en pause, y compris sur le promoteur LTR du VIH-1. Il est décrit que le VIH-1 exploiterait cette interaction entre KAP1 et 7SK snRNP pour libérer P-TEFb et transcrire son génome, en réponse à une stimulation (McNamara et al., 2016). Dernièrement, KAP1 a été retrouvé parmi les complexes protéiques associés aux RNA entiers, non épissés du VIH-1 (Knoener et al., 2017). KAP1 limite l'activation des gènes des rétrovirus MLV (Murine Leukemia Virus) et HTLV-1 suite à son recrutement de façon concomitante à HP1 et SETDB1 (Lee et al., 2018; Wolf and Goff, 2009).

KAP1 modifié par SUMO2 interagit avec la protéine LANA (Latency-Associated Nuclear Antigen) du KSHV, qui est essentielle à la réplication et à la persistance de l'épisome viral lors de la latence. LANA peut recruter KAP1 à de multiples sites sur l'ensemble du génome de KSHV. L'interaction de LANA avec KAP1 joue un rôle critique dans l'inhibition de l'expression des gènes lytiques au début de l'infection KSHV, afin de faciliter l'établissement de la latence (Sun et al., 2014). LANA est, aussi, capable de recruter KAP1 au facteur de transcription NRF2, présent sur les gènes lytiques, pour favoriser leur répression (Gjyshi et al., 2015). La suppression de l'expression de KAP1, suite à la déplétion du facteur de transcription STAT3, contribue à la réactivation lytique du KSHV latent, et souligne le rôle central de KAP1 dans la régulation de la latence virale (King et al., 2015).

La sumoylation de KAP1 par LMP1, la principale oncoprotéine virale, augmente la latence épigénétique de l'EBV, en favorisant la liaison de KAP1 sumoylée au gène lytique OriLyt (Bentz et al., 2015). Le rôle de KAP1 dans la latence de l'EBV a, également, été mis en évidence par une étude montrant la capacité de la chloroquine à utiliser ATM pour phosphoryler la S824 de KAP1 et réactiver l'EBV (Li et al., 2017).

Le répresseur transcriptionnel KAP1

Le recrutement de KAP1, conjointement avec HP1 et SETDB1, sur le génome viral du CMV entraîne sa latence transcriptionnelle. L'induction des phases lytiques de l'infection entraîne la phosphorylation de KAP1, qui reste toujours associée au génome viral, mais dont l'activité d'induction d'hétérochromatine est supprimée (Rauwel et al., 2015).

Au cours de l'infection productive à adénovirus, KAP1 est désumoyle afin de limiter le potentiel antiviral et répresseur de cette dernière. De plus, la sumoylation de la protéine virale E1B-55K par KAP1 est une étape cruciale à l'infection productive. Enfin, la désumoylation de KAP1 est dépendante de la sumoylation de E1B-55K sur la lysine 104, durant l'infection (Bürck et al., 2016).

Le répresseur transcriptionnel CTIP2

CTIP2 (Coup-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors) Interacting Protein 2), également appelé BCL11b (B Cell Leukemia 11b) ou RIT1 (Radiation Induced Tumor suppressor gene 1), est un facteur de transcription appartenant aux protéines à doigts de zinc C2H2. Le gène codant pour CTIP2 est présent sur le chromosome humain 14. Chez l'homme deux isoformes de CTIP2 alpha et beta de 823 et 894 acides aminés, issus d'un épissage alternatif, ont été décrits. CTIP2 possède six structures en doigts de zinc permettant les interactions DNA-protéines, des domaines protéiques riches en glutamates et en glycines, et des domaines impliqués dans les interactions protéine-protéine. CTIP2 est recrutée sur le promoteur des gènes qu'elle régule, soit directement par fixation des régions riches en G/C par ses domaines en doigts de zinc, ou bien indirectement à travers des interactions protéines-protéines, comme avec Sp1. Une fois sur le promoteur, CTIP2 va servir de plateforme d'ancrage à de multiples complexes protéiques (figure 45) (Cismasiu et al., 2005; Marban et al., 2005). CTIP2 est, fortement, exprimée dans le SNC. Elle dirige le développement des axones dans les neurones moteurs corticospinaux, et la différenciation de certains neurones du striatum. CTIP2 est présente dans la majorité des interneurones gabaergiques corticaux, et peut avoir un rôle dans la spécification des sous-types interneuronaux et dans la direction de la projection axonale (Lennon et al., 2017).

CTIP2 joue un rôle critique dans la différenciation des cellules T $\alpha\beta$. Le knock-out de CTIP2 des lymphocytes T précurseurs, démontre un arrêt de la différenciation au stade double négatif 2 immature (CD4-, CD8-). Dans ces lignées cellulaires, l'absence de différenciation est reconnue par la voie p53, qui conduit à une apoptose profonde des lymphocytes T CTIP2 -/-. Ces lymphocytes T immatures peuvent, également, être reprogrammés en cellules NK (Li et al., 2010; Okazuka et al., 2005).

CTIP2 est importante dans le maintien de l'épithélium mammaire, l'intégrité des cellules souches épidermiques ainsi que la biosynthèse des sphingolipides. CTIP2 est requise à l'odontogenèse des mammifères, et elle est cruciale pour la morphogenèse de la papille linguale et la différenciation de l'épithélium buccal (Lennon et al., 2017).

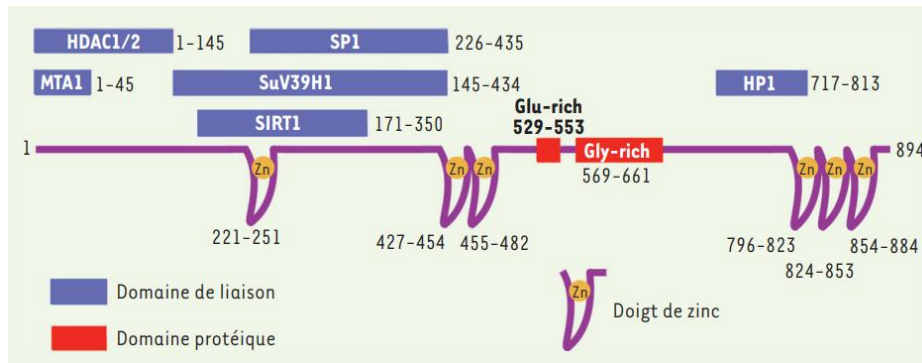


Figure 45 : Structure de la protéine CTIP2. Les domaines protéiques de CTIP2 sont représentés par les structures en doigt de zinc, qui permettent les interactions DNA-protéines, les domaines protéiques riches en glutamates et en glycines (rouge) et les domaines impliqués dans les interactions protéines-protéines (bleu) (Le Douce et al., 2014a).

1- CTIP2, un inhibiteur du facteur d'élongation P-TEFb

L'analyse des profils d'expression géniques cibles de CTIP2 et P-TEFb, ont montré, par la surexpression de CTIP2 ou l'inhibition de P-TEFb, qu'environ 25% des gènes régulés par CTIP2, le sont aussi par P-TEFb. Par exemple, l'expression du gène codant pour la chaîne lourde de la β -myosine des sarcomères cardiaques est réprimée par une surexpression de CTIP2, et par l'inhibition de l'activité kinase de CDK9. Cherrier *et al.*, démontrent que CTIP2 est associée au complexe 7SK snRNP, et inhibe l'activité de P-TEFb par répression de l'activité kinase de la sous-unité catalytique CDK9 de P-TEFb (Cherrier et al., 2013).

2- Implication de CTIP2 dans la régulation du VIH-1

CTIP2 a été, fortement, associée aux réservoirs latents du VIH-1 dans le SNC. Desplats *et al.*, ont démontré que CTIP2 était élevé dans le LCR des patients infectés par le VIH-1 latent. Les analyses d'immunomarquage de tissus post-mortem ont montré que CTIP2 est présente, à la fois, dans les astrocytes, les microglies et le LCR. Son expression est, significativement, plus élevée chez les groupes de patients avec du VIH latent dans le SNC, par rapport aux patients asymptomatiques nommés « HIV controllers », et aux patients symptomatiques chez lesquels la production virale était associée à une encéphalite. Cette augmentation de CTIP2 est corrélée à une augmentation de l'expression d'HDAC1, MeCP2, HP1, et associée à une dérégulation des gènes pro-inflammatoires. Ainsi, l'augmentation d'IL-6 et de TNF- α chez les patients VIH latent, fournirait une explication aux dommages observés dans le cerveau, en l'absence de réplication virale (Desplats et al., 2013).

CTIP2 comporte de multiples actions menant à la répression transcriptionnelle du VIH-1. Les précédents travaux de notre laboratoire ont montré que CTIP2 inhibe la transcription du VIH-1

dans les cellules microgliales, en recrutant des complexes de remodelage de la chromatine tels que HDAC1/2 et SUV39h1 au promoteur viral (Marban et al., 2007). Des expériences menées dans des lymphocytes T CD4⁺ ont, par la suite, montré que l'effet répresseur de CTIP2 est lié au recrutement du complexe NuRD (Cismasiu et al., 2008). CTIP2 inhibe, également, la transcription du VIH-1 dans les cellules microgliales, par inhibition de l'activité de Tat. Plus précisément, CTIP2 conduit à la perturbation de la localisation nucléaire de Tat et à son recrutement dans des structures nucléaires nommées « ball-like structures », induites par CTIP2. Ces observations sont le résultat d'une relocalisation de Tat dans des régions inactives de la chromatine, via la formation d'un complexe Tat-CTIP2-HP1 α (Rohr et al., 2003a).

CTIP2 interagit avec LSD1. Ancrés au promoteur du VIH-1, ces deux facteurs cellulaires coopèrent pour réprimer la transcription précoce et tardive, Tat dépendant du VIH-1 (Le Douce et al., 2012). L'activité répressive de CTIP2 sur la protéine virale Tat s'explique, également, par sa capacité à réprimer P-TEFb. CTIP2 et HMGA1 coopèrent pour réguler un groupe de gènes cellulaires, sensibles à P-TEFb, ainsi que les gènes du VIH-1. La déplétion simultanée de CTIP2 et HMGA1 produit une augmentation de la phase d'initiation et Tat dépendante de la transcription des gènes viraux. HMGA1 servirait à recruter CTIP2 associée au complexe 7SK snRNP (Eilebrecht et al., 2014). Une autre étude montre que le facteur de transcription HIC1 interagit avec CTIP2 pour réguler une centaine de gènes cellulaires. Bien qu'HIC1 réprime la transcription Tat dépendante du VIH-1, aucune coopération fonctionnelle n'a pu être observée avec CTIP2 pour le contrôle de la réplication virale (Le Douce et al., 2016).

En plus de son influence directe sur le promoteur du VIH-1, CTIP2 a une action pléiotropique à travers le contrôle de gènes cellulaires importants pour le virus. La cycline CDKN1A/p21^{waf} a été décrite comme favorisant la transcription du VIH-1 dans les lignées monocyte-macrophages (Vázquez et al., 2005). Recrutée sur le promoteur du gène *p21*, CTIP2 inhibe sa transcription, en induisant des modifications épigénétiques identiques à celles décrites ci-dessus sur le promoteur viral (Cherrier et al., 2009). Cet effet favorise, indirectement, la latence du VIH-1 puisque l'activation du gène *p21* stimule l'expression virale dans les macrophages (Vázquez et al., 2005). CTIP2 génère, ainsi, un environnement cellulaire défavorable à la réactivation virale ce qui favorise la latence du VIH-1 (figure 46).

En dehors de ces effets sur la réplication du VIH-1, les mRNA, de même que l'expression protéique de CTIP2, sont diminuées dans les lignées cellulaires T infectées par HTLV-1. Tax se lie, physiquement, à CTIP2 et induit sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome. De plus, il a été observé que la surexpression ectopique de CTIP2 dans les lymphocytes T infectés par HTLV-1, inhibe, significativement, leurs capacités prolifératives.

Ainsi, la dégradation de CTIP2 par la protéine Tax démontre le rôle leucémogène important de Tax (Permatasari et al., 2017).

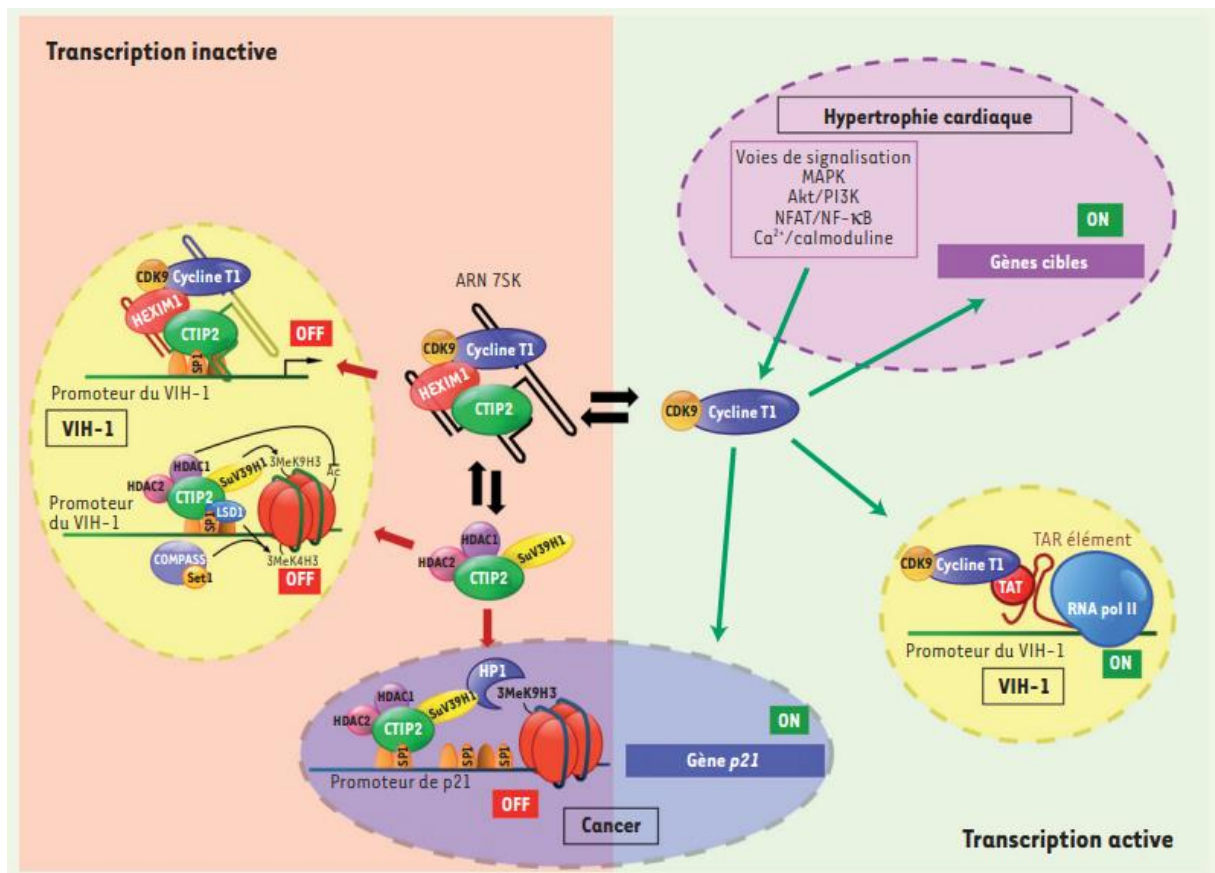


Figure 46 : Représentation schématique de la régulation transcriptionnelle des gènes par CTIP2 (Le Douce et al., 2014a).

3- CTIP2 n'est pas uniquement répresseur

Bien qu'elle ait été à l'origine caractérisée comme répresseur transcriptionnel, CTIP2 peut se comporter comme un activateur des gènes de l'IL2 dans les cellules T CD4⁺ activées (Dubuissez et al., 2016; Zhang et al., 2012). Ce double comportement de CTIP2, en tant que répresseur et activateur transcriptionnel, n'est pas, entièrement, compris, mais repose clairement sur des modifications post-traductionnelles survenant sur CTIP2. Des analyses de spectrométrie de masse à partir de thymocytes traités au phorbol ester et calcium ionophore, afin de mimer l'activation du TCR, ont révélé plusieurs sites de phosphorylation et un site de sumoylation sur la K679 de CTIP2 (Zhang et al., 2012). Globalement, dans des cellules T CD4⁺ non stimulées, CTIP2 est liée à la sous-unité MTA1 du complexe NuRD, et réprime la transcription du gène de l'IL2. Par activation du TCR, la phosphorylation de la Sérine 2 de CTIP2 entraîne sa dissociation du complexe NuRD, mais reste associée au promoteur de l'IL2. La sumoylation de

K679 de CTIP2 entraîne le recrutement de p300, pour activer la transcription. Après 5 heures de traitement, CTIP2 serait : soit ubiquitinée et orientée vers une dégradation par le protéasome ou soumis à une répression transcriptionnelle par KLF4 (Dubuissez et al., 2016; Zhang et al., 2012).

4- Implication de CTIP2 en pathologies

Comme CTIP2 est un inhibiteur de P-TEFb, elle est ainsi impliquée dans plusieurs pathologies dépendantes de P-TEFb telles que le cancer et l'hypertrophie cardiaque. Les voies de signalisation cellulaire, impliquées dans le développement de l'hypertrophie cardiaque, dont les voies MAPK, Ca²⁺/calmoduline, NF-κB et PI3K/AKT, sont contrôlées par CTIP2. De façon remarquable, toutes ces voies facilitent le recrutement de P-TEFb sur les gènes cibles pour stimuler leur transcription et entraîner une hypertrophie cardiaque. CTIP2 pourrait moduler ces voies de signalisation en inhibant l'activité de CDK9 et, ainsi, empêcher le développement de l'hypertrophie cardiaque (Le Douce et al., 2014b). Il est démontré que le gène codant pour la protéine de la chaîne lourde de la β-myosine sarcomérique, qui est considérée comme un marqueur d'hypertrophie, est régulée négativement par la surexpression de CTIP2 et par l'inhibition de CDK9. CTIP2 est retrouvée ancrée au promoteur du gène de la chaîne lourde de la β-myosine et associée au complexe P-TEFb inactif, empêchant ainsi le développement d'hypertrophies cardiaques (Cherrier et al., 2013), (figure 46).

Une diminution de l'expression de CTIP2 dans les lymphocytes T régulateurs est retrouvée dans des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, comme la rectocolite ulcéro-hémorragique et la maladie de Crohn (VanValkenburgh et al., 2011). Un autre groupe a trouvé un phénomène semblable dans la peau, où la déplétion de CTIP2 dans les kératinocytes avait induit une réaction inflammatoire telle que la dermatite (Wang et al., 2012).

En effet, CTIP2 a été décrit comme un gène suppresseur de tumeur et un oncogène et a été impliqué dans des hémopathies malignes (Gutierrez et al., 2011). CTIP2 est décrite pour sa capacité de réguler positivement l'activité des voies NF-κB/NFAT dans un contexte d'activation de TCR par régulation positive de gènes menant à la dégradation d'IκB (Cismasiu et al., 2009). En effet, la dérégulation de ces voies, par activation persistante, sont impliquées dans le développement de cancers, incluant des leucémies aiguës lymphoblastiques (T-ALL, T-lineage acute lymphoblastic leukemia) et des tumeurs solides comme le sarcome d'Ewing (Medyounf and Ghysdael, 2008).

5- Implications thérapeutiques

Il est, maintenant, évident que de multiples pathologies sont liées à une dérégulation de CTIP2, qui constitue, avec ses complexes associés, des cibles thérapeutiques potentielles. La répression de l'expression de CTIP2 par interférence RNA dans les T-ALL a été proposée (Grabarczyk et al., 2007). En effet, l'absence de CTIP2 conduit à l'apoptose des cellules malignes, mais pas des cellules matures normales. De plus, cibler l'enzyme SUV39h1, associée à CTIP2, par la chaetocine a été décrit comme un traitement efficace contre T-ALL. Cependant, il est à signaler que de nombreux médicaments ciblant les voies de signalisation modulées par CTIP2 ont des effets indésirables tels que la cardiotoxicité. Le ciblage des enzymes associées à CTIP2 pourrait fonctionner dans le traitement du cancer, mais des études cliniques montrant l'absence d'effets secondaires sont nécessaires avant leur utilisation (Le Douce et al., 2014b). Dans les stratégies de « shock and kill », plusieurs protéines associées à CTIP2, impliquées dans la formation d'hétérochromatine, ont été identifiées comme cibles permettant la réactivation virale. En revanche, et comme mentionné précédemment, l'utilisation de combinaisons d'HDACis, HMTis et d'agonistes de P-TEFb, est insuffisante pour l'élimination des réservoirs réactivés. Cette élimination nécessiterait la mise en place de différentes approches immunothérapeutiques qui augmentent l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8. Enfin, l'identification de nouveaux partenaires d'interaction de CTIP2 permettrait une meilleure compréhension de son impact sur le contrôle de la transcription virale et contribuerait sans doute à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Objectif du projet de thèse

Le VIH-1 est un problème de santé mondial, avec 37,6 millions de personnes porteuses du virus. En l'absence de thérapie permettant une guérison stérilisante, les patients sont traités aux HAART, qui leur permettent de contrôler efficacement la charge virale. Cependant, ils restent condamnés à suivre ce traitement tout au long de leur vie. Les stratégies visant à guérir les patients ont fait face à de nombreux obstacles, notamment, la formation et la persistance des réservoirs latents de VIH-1 qui sont à l'origine d'échecs thérapeutiques. Bien que de nombreux mécanismes moléculaires, impliqués dans l'établissement, le maintien et la réactivation du virus latent, soient bien décrits, des lacunes existent encore dans les stratégies à base de LRA (Latency Reversing Agent). L'objectif des LRAs étant de réactiver les réservoirs latents en ciblant les enzymes de modulation épigénétique de la chromatine au promoteur du VIH-1. Ainsi, l'identification de nouvelles voies, et, donc, de nouvelles cibles, impliquées dans l'établissement, le maintien de la latence et la réactivation épigénétiques des réservoirs du VIH-1, sont nécessaires au développement de nouvelles classes de LRAs.

Le premier objectif de mon travail de thèse a consisté à tester le potentiel de réactivation virale de différents agents, seuls ou en combinaison, tels que des agonistes de la voie PKC (prostratin, bryostatin-1 et ing-B), qui sont connus pour activer la voie NF- κ B ainsi que P-TEFb, ou des agents libérant P-TEFb (JQ1, I-BET, I-BET151 et HMBA). Ces expériences ont été réalisées sur des lignées cellulaires lymphoïdes et myéloïdes, modèles de la latence post-intégrative du VIH-1, et sur des cultures *ex vivo* de CD4⁺ ou de PBMC CD8⁺ déplétées de, respectivement, 15 et 35 patients avirémiques traités par HAART. Le but de ce travail était de valider de façon concrète que la co-administration de deux types différents de LRAs constitue une stratégie potentielle de réduction de la taille des réservoirs latents du VIH-1.

Notre laboratoire a, précédemment, démontré l'importance de CTIP2 dans l'établissement et la persistance de la latence post-intégrative du VIH-1 dans les cellules microgliales : les réservoirs majeurs du VIH-1 dans le système nerveux central. Ce facteur cellulaire contribue à l'établissement d'une structure hétérochromatinienne au niveau du promoteur viral et, donc, à l'inhibition de l'expression de ses gènes dans les réservoirs (Marban et al., 2007). De même, CTIP2 est retrouvée associée au complexe 7SK snRNP pour inhiber P-TEFb, qui est un facteur d'élongation indispensable à l'expression du VIH-1 et à la réactivation des provirus latents (Cherrier et al., 2013). Plus récemment, nous avons révélé que la protéine virale Vpr dégrade CTIP2 dans les cellules infectées de façon productive par le VIH-1 (Forouzanfar et al., 2017

article soumis à EMBO). De plus, le ciblage par des LRAs des facteurs associés à CTIP2 s'est révélé très efficace dans le cadre de tests de réactivation.

Le deuxième objectif de mon travail de thèse a consisté à purifier et identifier de nouveaux partenaires cellulaires associés à CTIP2. Parmi ces partenaires, nous avons identifié des facteurs de la voie SUMO, laissant présager une implication de la sumoylation dans le contrôle de la latence post-intégrative du VIH-1. Parmi ces facteurs, nous avons noté la présence particulière de KAP1 au sein des nouveaux partenaires de CTIP2. KAP1 est décrit comme un répresseur transcriptionnel portant, notamment, une activité de SUMO E3 ligase. Nous avons étudié et caractérisé le mécanisme d'action de KAP1 et de ses partenaires impliqués dans la voie SUMO tels que SENP1 et UBC9 dans la régulation de l'activité transcriptionnelle basale et Tat dépendante du VIH-1.

Le but de nos travaux étant d'étudier l'influence de la voie SUMO dans le contrôle de la latence post-intégrative du VIH-1. Au même titre que l'acétylation ou les méthylations, les sumoylations pourraient constituer un nouveau champ d'investigation dans le cadre du développement de nouveaux LRAs.

Résultats

Publication 1

La Comparaison de différentes Combinaisons d'agents réactivateurs de latence dans divers modèles *in vitro* et *ex vivo* de Latence du VIH-1 a identifié la Bryostatine-1+JQ1 et Ingenol-B+JQ1 comme des réactivateurs potentiels de l'expression virale

Résumé

La persistance de cellules infectées de manière latente chez les patients sous traitement antirétroviral (cART : combinatory antiretroviral therapy) constitue un obstacle majeur à l'éradication du VIH-1. Des stratégies de purge de ces réservoirs sont nécessaires et l'activation de l'expression des gènes viraux dans les cellules infectées de manière latente constitue une voie prometteuse de guérison. Des composés tels que les inhibiteurs BET (Bromodomain and Extraterminal bromodomain inhibitors : BETi) sont capables de réactiver les provirus latents de façon dépendante au facteur cellulaire d'élongation de la transcription p-TEFb. Dans cette étude, des activateurs potentiels de la voie PKC (prostratin, bryostatine-1 et Ingenol-B), connus pour activer la voie NF- κ B et p-TEFb utilisés seuls ou en combinaison avec des agents entraînant la libération de p-TEFb (HMBA et BETi (JQ1, I-BET, I-BET151)), ont été testés. Par l'utilisation de modèles cellulaires, *in vitro*, de latence post-intégrative du VIH-1, représentés par des lignées lymphoïdes-T et myéloïdes, nous avons démontré que les agonistes de la voie PKC et les agents libérant p-TEFb utilisés seuls, agissent comme de puissants agents d'inversion de latence (LRA : Latency Reversing Agents) et que leurs combinaisons conduisent à une activation synergique de l'expression du VIH-1, tant au niveau des mRNA viraux que des protéines virales. Au niveau mécanistique, les traitements combinés ont conduit à des activations plus élevées de p-TEFb et NF- κ B, comparés aux traitements pris séparément. Dans des cultures *ex vivo* de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) CD8⁺ déplétées de 35 patients VIH-1 avirémiques traités par cART, nous avons observé une synergie de réactivation après un traitement combiné bryostatine-1+JQ1. Le niveau de réactivation était identique au pourcentage de réactivation observé avec les anticorps contrôles positifs de stimulation (anti-CD3+anti-CD28). Remarquablement, dans des cultures *ex vivo* de cellules T CD4⁺ quiescentes isolées à partir de 15 patients VIH-1 avirémiques traités par cART, les combinaisons bryostatine-1+JQ1 et Ingenol-B+JQ1 ont conduit à la libération de virus infectieux à des

niveaux similaires à ceux obtenus avec le contrôle positif de stimulation. Les puissants effets de ces deux traitements combinés ont été détectés au bout de 24 heures de stimulation. Ces résultats représentent une nouvelle preuve que l'administration combinée de deux différents types de LRA contribuerait à réduire efficacement la taille des réservoirs latents du VIH-1.

Ma contribution à ce travail a, principalement, consisté à comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activation synergique de la transcription et de la production du VIH-1, à la suite des traitements bryostatine-1+JQ1. J'ai étudié l'effet de ces LRAs seuls ou en combinaison sur la libération de p-TEFb.

RESEARCH ARTICLE

An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various *In Vitro* and *Ex Vivo* HIV-1 Latency Models Identified Bryostatin-1+JQ1 and Ingenol-B+JQ1 to Potently Reactivate Viral Gene Expression

Gilles Darcis^{1,2}✉, Anna Kula¹✉, Sophie Bouchat¹, Koh Fujinaga³, Francis Corazza⁴, Amina Ait-Ammar⁵, Nadège Delacourt¹, Adeline Melard⁶, Kabamba Kabeya⁷, Caroline Vanhulle¹, Benoit Van Driessche¹, Jean-Stéphane Gatot⁸, Thomas Cherrier⁹, Luiz F. Pianowski¹⁰, Lucio Gama¹¹, Christian Schwartz⁵, Jorge Vila¹, Arsène Burny¹, Nathan Clumeck⁷, Michel Moutschen², Stéphane De Wit⁷, B. Matija Peterlin³, Christine Rouzioux⁶, Olivier Rohr^{5,12}‡, Carine Van Lint¹‡*



 OPEN ACCESS

Citation: Darcis G, Kula A, Bouchat S, Fujinaga K, Corazza F, Ait-Ammar A, et al. (2015) An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various *In Vitro* and *Ex Vivo* HIV-1 Latency Models Identified Bryostatin-1+JQ1 and Ingenol-B+JQ1 to Potently Reactivate Viral Gene Expression. *PLoS Pathog* 11(7): e1005063. doi:10.1371/journal.ppat.1005063

Editor: Jonathan Karn, Case Western Reserve University School of Medicine, UNITED STATES

Received: February 27, 2015

Accepted: July 2, 2015

Published: July 30, 2015

Copyright: © 2015 Darcis et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

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

Funding: We acknowledge grant support from the "Agence Nationale de Recherches sur le SIDA" (ANRS, France), the Belgian Fund for Scientific Research (FRS-FNRS, Belgium), the "Fondation Roi Baudouin", the NEAT program, the Walloon Region (the Excellence Program "Cibles") and the "Institut Universitaire de France (IUF)" (to OR). AK is a post-doctoral fellow of "Les Amis des Instituts Pasteur à

1 Service of Molecular Virology, Institut de Biologie et de Médecine Moléculaires (IBMM), Université Libre de Bruxelles (ULB), Gosselies, Belgium, **2** Service des Maladies Infectieuses, Université de Liège, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Liège, Domaine Universitaire du Sart-Tilman, Liège, Belgium, **3** Departments of Medicine, Microbiology, and Immunology, University of California, San Francisco, San Francisco, California, United States of America, **4** Laboratory of Immunology, Brugmann University Hospital, Université Libre de Bruxelles (ULB), Bruxelles, Belgium, **5** Institut Universitaire de Technologie Louis Pasteur de Schiltigheim, University of Strasbourg, Schiltigheim, France, **6** Service de Virologie, Université Paris-Descartes, AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France, **7** Service des Maladies Infectieuses, CHU St-Pierre, ULB, Bruxelles, Belgium, **8** Service de Génétique, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Liège, Domaine Universitaire du Sart-Tilman, Liège, Belgium, **9** IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Illkirch-Graffenstaden, France, **10** Kyolab, Rua Isaura Ap. Oliveira Barbosa Terini, Sao Paulo, Brazil, **11** Department of Molecular and Comparative Pathobiology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, United States of America, **12** Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale, EA7292, University of Strasbourg, University of Strasbourg, Strasbourg, France

✉ These authors contributed equally to this work.
 ‡ OR and CVL also contributed equally to this work.
 * cvlint@ulb.ac.be

Abstract

The persistence of latently infected cells in patients under combinatory antiretroviral therapy (cART) is a major hurdle to HIV-1 eradication. Strategies to purge these reservoirs are needed and activation of viral gene expression in latently infected cells is one promising strategy. Bromodomain and Extraterminal (BET) bromodomain inhibitors (BETi) are compounds able to reactivate latent proviruses in a positive transcription elongation factor b (P-TEFb)-dependent manner. In this study, we tested the reactivation potential of protein kinase C (PKC) agonists (prostratin, bryostatin-1 and ingenol-B), which are known to activate NF-κB signaling pathway as well as P-TEFb, used alone or in combination with P-TEFb-releasing agents (HMBA and BETi (JQ1, I-BET, I-BET151)). Using *in vitro* HIV-1 post-integration latency model cell lines of T-lymphoid and myeloid lineages, we demonstrated that PKC agonists and P-TEFb-releasing agents alone acted as potent latency-reversing agents (LRAs) and that their combinations led to synergistic activation of HIV-1

Bruxelles, asbl". SB is a fellow of the Belgian « Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture (FRIA) ». BVD is an ANRS post-doctoral fellow. GD and CVL are Aspirant fellow and Research Director of the FRS-FNRS, respectively. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: LFP is a share holder of Kyolab laboratories. He also has a contact with Amazonia Fitomedicamentos to develop the ingenol derivatives. This does not alter the authors' adherence to Plos Pathogens policies on sharing data and materials.

expression at the viral mRNA and protein levels. Mechanistically, combined treatments led to higher activations of P-TEFb and NF- κ B than the corresponding individual drug treatments. Importantly, we observed in *ex vivo* cultures of CD8+-depleted PBMCs from 35 cART-treated HIV-1+ aviremic patients that the percentage of reactivated cultures following combinatory bryostatin-1+JQ1 treatment was identical to the percentage observed with anti-CD3+anti-CD28 antibodies positive control stimulation. Remarkably, in *ex vivo* cultures of resting CD4+ T cells isolated from 15 HIV-1+ cART-treated aviremic patients, the combinations bryostatin-1+JQ1 and ingenol-B+JQ1 released infectious viruses to levels similar to that obtained with the positive control stimulation. The potent effects of these two combination treatments were already detected 24 hours post-stimulation. These results constitute the first demonstration of LRA combinations exhibiting such a potent effect and represent a proof-of-concept for the co-administration of two different types of LRAs as a potential strategy to reduce the size of the latent HIV-1 reservoirs.

Author Summary

Persistence of latently infected cells during cART is a major hurdle for HIV-1 eradication. A widely proposed strategy to purge these reservoirs involves the reactivation of latent proviruses. The low levels of active P-TEFb and the cytoplasmic sequestration of NF- κ B in resting infected cells largely contribute to maintenance of HIV-1 latency. Therefore, utilization of chemical compounds that target both pathways may lead to more potent effects on HIV-1 reactivation than the effect mediated by the individual drug treatments. In this study, we showed that combined treatments of PKC agonists (prostratin, bryostatin-1 and ing-B) with compounds releasing P-TEFb (JQ1, I-BET, I-BET151 and HMBA) exhibited a synergistic increase in viral reactivation from latency. In-depth comparison of combined treatments in various *in vitro* cellular models of HIV-1 latency as well as in *ex vivo* primary cell cultures from cART-treated HIV⁺ aviremic patients identified bryostatin-1+JQ1 and ing-B+JQ1 to potently reactivate latent HIV-1. The potent effects of these two combinations were detected as early as 24 hours post-treatment. Importantly, bryostatin-1 was used at concentrations below the drug plasma levels achieved by doses used in children with refractory solid tumors. Our mechanistic data established a correlation between potentiated P-TEFb activation and potentiated or synergistic (depending on the HIV-1 latency cellular model used) induction of HIV-1 gene expression observed after the combined versus individual drug treatments. In conclusion, our results establish a proof-of-concept for PKC agonists combined with compounds releasing active P-TEFb as a strategy proposed for a cure or a durable remission of HIV infection.

Introduction

Recent advances in cART have greatly improved the quality of life for people with HIV-1 infection. However, cART is not curative and patients must stay on therapy indefinitely. Moreover, cART is costly and requires ongoing medical care. Chronic HIV infection, even when suppressed by cART, presents long-term health risks including cancers, cardiovascular diseases or neurocognitive disorders [1,2]. Consequently, achieving either a sterilizing cure (elimination of HIV-1 from the human body) or a remission (a long-term control of HIV in the absence of

cART) remains crucial. Persistence of latently infected cells during cART is a major hurdle for HIV-1 eradication [3]. These latently infected cells contain stably integrated, transcriptionally silent but replication-competent proviruses, thereby representing the state of post-integration latency and some of the HIV-1 latent reservoirs. Although many cells may contribute to the latent reservoirs, including monocytes and monocyte-derived macrophages [4,5] (reviewed in [6,7]), the best characterized one is a small population of long-lived HIV-1-infected resting memory CD4⁺ T cells, maintained throughout patient life by homeostatic proliferation and clonal expansion due to specific HIV integration sites [8,9]. The absence of viral gene expression in latently infected cells enables viral escape from host immune system. However, the reservoirs can be induced by various cellular stimuli and therefore represent one potential source of rebound of viremia after cART interruption [10].

Although the discovery of latent reservoirs diminished hopes for eradication, the French VISCONTI study describes patients characterized not only by an extremely low viral reservoir but also by a skewed distribution of this reservoir, whose viremia remains controlled for several years after treatment interruption [11]. Consequently, a decline of the HIV-1 latent reservoir to a level sufficient to permit an efficient control of the infection by the host immune system would represent an important step in order to achieve long-term virological suppression. A widely proposed strategy to reach this goal involves the reactivation of latent proviruses while maintaining cART in order to prevent new spreading infection. This kind of strategy would allow latently infected cells to die from viral cytopathic effect or host immune response. Multiple mechanisms are involved in establishment and maintenance of HIV-1 latency, including (i) epigenetic modifications in the HIV-1 promoter region, (ii) the absence of inducible cellular transcription factors such as NF- κ B, (iii) the absence of the HIV-1 transcriptional transactivator (Tat) and Tat-associated factors and (iv) the sequestration of P-TEFb within the 7SK small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) repressive complex including the 7SK snRNA, the hexamethylene bisacetamide inducible protein 1 (HEXIM1), the 5' methylphosphate-capping enzyme (MePCE) and the La-related protein (LARP7). The increasing understanding of these mechanisms allowed the identification of LRAs that can abort the state of proviral quiescence and elicit viral expression.

The protein kinase C (PKC) pathway leading to the activation of NF- κ B and AP-1 is one of the most important pathway in HIV-1 reactivation (reviewed in [12–14]). Many PKC agonists were considered for purging the reservoirs of latent HIV-1. The phorbol ester prostratin stimulates HIV-1 expression in latently infected T-lymphoid and myeloid cell lines but also in primary cells [15–19] with minimal effects on the immune system [20]. However, the suitability of prostratin for use in humans is still unknown. Bryostatin-1 at low nanomolar concentrations robustly reactivates latent HIV-1 in lymphocytic and monocytic cellular models of post-integration latency and synergizes with histone deacetylase inhibitors (HDACi) to reactivate virus expression in *in vitro* lymphocytic HIV-1 latency models [21,22]. Of note, bryostatin-1 is a PKC agonist that has been tested in more than 20 clinical trials for cancers and Alzheimer's disease (reviewed in [23]) and showed minimal toxicity [24]. Recently, derivatives of ingenol ester have been considered for reactivation of HIV-1 expression. In particular, ingenol-B (ingenol-3-hexanoate) referred as to ing-B hereafter, was shown to reactivate HIV-1 in *in vitro* latently infected T cell lines and in *ex vivo* CD4⁺ T cells cultures isolated from cART-treated HIV⁺ aviremic patients [25–27]. Concerning safety, ing-B has been evaluated *in vivo* in rats and dogs (Aurigon Life Science, Germany, oral communication) and Rhesus macaques (L. Gama, oral communication) by oral dosing and presented low toxic profile. Importantly, these three PKC agonists exhibit anti-viral activity by downregulating the expression of the HIV-1 receptor CD4 and the coreceptors CXCR4 and CCR5 on the host cell surface, which would lead to the blockade of *de novo* infection [16,22,25].

Although the recruitment of the transcription initiation complex to promoters has long been recognized to play a key role in the regulation of gene expression, the emphasis is now equally placed at subsequent steps of transcription, including elongation. Indeed, the low levels of active P-TEFb in resting CD4⁺ T cells may constitute another major barrier to efficient HIV transcription. Activation of several signaling pathways results in post-translational modifications of P-TEFb subunits and HEXIM-1 [28] which can prevent the sequestration of P-TEFb by the 7SK snRNP complex. Thus, upon cellular activation and when Tat is not produced yet, P-TEFb is released from the 7SK snRNP complex, and associates with the bromodomain-containing protein 4 (BRD4), thereby forming the active P-TEFb complex. P-TEFb is then recruited to the HIV LTR *via* interactions of the BRD4 bromodomains with acetylated histones. Once Tat has been synthesized, on one hand, Tat competes with BRD4 for binding to P-TEFb. On the other hand, Tat is also able to disrupt the inactive P-TEFb complex by displacing HEXIM1 and forming a stable complex with P-TEFb. Tat then recruits P-TEFb to the HIV-1 promoter through TAR and increases transcription elongation [14,29]. Tat can also recruit, in addition to P-TEFb, other elongation factors (such as ELL2, AFF4, ENL and AF9), thereby forming the superelongation complex [30]. Thus, the HIV-1 promoter is critically dependent on levels and activity of P-TEFb. Therefore, the sequestration of P-TEFb in the inactive 7SK snRNP complex is a key factor contributing to HIV latency.

Chemical compounds named Bromodomain and Extraterminal (BET) bromodomain inhibitors (BETi) block the BET bromodomain interaction with acetylated lysine residues. BET-containing protein BRD4 has been shown to be the most specific target of BETi. BETi inhibit BRD4 interaction with P-TEFb and favor the recruitment of PTEFb by Tat to the HIV-1 promoter [31–33]. Moreover, BETi also act by releasing P-TEFb from the 7SK snRNP complex [31]. BETi such as JQ1, I-BET, I-BET151 and MS417 have recently been identified as able to reactivate HIV-1 from latency *in vitro* in several cellular models of HIV-1 post-integration latency, but also *ex vivo* in primary cells isolated from cART-treated HIV⁺ aviremic patients [31,32,34–36]. HMBA (Hexamethylene bisacetamide) is another compound that transiently activates the PI3K/Akt pathway leading to the phosphorylation of HEXIM1 and the subsequent release of P-TEFb from its transcriptionally inactive complex with HEXIM1 and 7SK snRNA [37]. Importantly, PKC agonists have recently been described as involved in P-TEFb regulation not only because they can increase the synthesis of CycT1 and CDK9 in resting CD4⁺ T cells [27,38,39], but also because they can release P-TEFb from the 7SK snRNP complex [40].

In the present study, we demonstrated that individual treatments with P-TEFb releasing compounds (JQ1, I-BET, I-BET151 and HMBA) or PKC agonists (prostratin and bryostatin-1) induced HIV-1 expression which was synergistically increased after combined treatments in several *in vitro* post-integration latency cellular models of T-lymphoid and myeloid lineages. We next compared the reactivation potentials of PKC agonist (including ing-B)+BETi/HMBA co-treatments in *ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs and of resting CD4⁺ T cells isolated from a high number of cART-treated HIV⁺ aviremic patients. We identified for the first time that co-treatments of JQ1 combined with either bryostatin-1 or ing-B induced extracellular genomic HIV-1 RNA levels to a degree comparable to that obtained after anti-CD3+anti-CD28 antibodies stimulation. The measurements of extracellular genomic HIV-1 RNA levels at multiple time points showed that this potent effect of combined treatments was already detectable one day after stimulation. Therefore, these combinations represent promising candidates for the shock and kill strategy proposed for HIV cure.

Mechanistically, using four independent assays (immunoprecipitations, biomolecular fluorescence complementation assays, reporter gene assays and experiments using various signaling pathways inhibitors), we demonstrated that PKC agonists (such as bryostatin-1) and BETi (such as JQ1) caused a more potent activation of P-TEFb when used in combination than

when used individually. Taken together, these mechanistic data established a correlation between the potentiated P-TEFb activation and the potentiated or synergistic (depending on the HIV-1 latency cellular model used) induction of HIV-1 gene expression observed after the combined versus individual LAR treatments. This potentiated release of P-TEFb from the inactive 7SK snRNP complex could explain the potentiated or synergistic activation of HIV-1 gene expression induced by PKC agonist+BETi/HMBA combined treatments. Moreover, the synergistic activation of HIV-1 obtained after cotreatments was dependent on NF- κ B.

Results

Synergistic activation of HIV-1 production in several *in vitro* latency models by combined treatments of compounds releasing active P-TEFb with either prostratin or bryostatin-1

To assess whether compounds releasing active P-TEFb (JQ1, I-BET, I-BET151 and HMBA) synergize with PKC agonists (prostratin and bryostatin-1) in reactivating HIV from latency, we first determined their optimal concentrations in terms of both their HIV-1 reactivation potential and their cellular toxicity (S1 Fig). We measured induction of HIV-1 p24 capsid protein production by p24-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and we estimated the cell viability by tetrazolium salt-based assay which assesses cell metabolic activity in two well-studied HIV-1 latency cellular models, the T-lymphoid J-Lat 9.2 and promonocytic U1 cell lines. Increasing doses of compounds of interest augmented p24 antigen level in the cell supernatants at 24 hours post-treatment in a dose-dependent manner and caused a decrease in metabolic activity of less than 30% (S1 Fig). Based on our reactivation potential and cell viability data we selected two concentrations of BETi/HMBA and three concentrations of PKC agonists for combinations studies (Fig 1). Two compounds synergize when their combination produces higher effect than the sum of effects arising from separate treatments. We observed a synergistic activation of virus production in the J-Lat 9.2 cell line (Fig 1A and 1C). Bryostatin-1 at 5nM and 10nM produced synergistic increases in p24 production with each dose of BETi/HMBA (Fig 1A). Prostratin at 1.25 μ M and 2.5 μ M concentrations also synergized with each dose of BETi/HMBA and the fold-synergy was even higher than the one observed for bryostatin-1+BETi/HMBA combinations (compare Fig 1C to 1A). We also observed high synergistic activations of virus production in the promonocytic U1 cell line (Fig 1B and 1D). Interestingly, synergy in U1 cells was even higher than the one observed in J-Lat 9.2 cell line. Importantly, combined treatments of 10nM bryostatin-1 or 2.5 μ M prostratin with 0.5 μ M BETi and 5mM HMBA were the most potent among the tested combinations and produced in most cases the highest synergies in both cellular models. Of note, the same concentrations also produced synergistic activation of virus production in another HIV-1 latency model of promyelocytic origin, the OM10.1 cell line (S2 Fig). The OM10.1 cell line constitutes a more physiological model of HIV latency than the U1 monocytic cell line, since the latter contains HIV proviruses harboring mutations in *tat* gene. Therefore, we chose these drug concentrations for the next reactivation studies.

In conclusion, our results demonstrated that PKC agonists such as prostratin and bryostatin-1 synergistically increased HIV-1 production when combined with BETi/HMBA in lymphocytic and myeloid post-integration latency models, representative of the two main cell types infected by HIV-1 in the natural host.

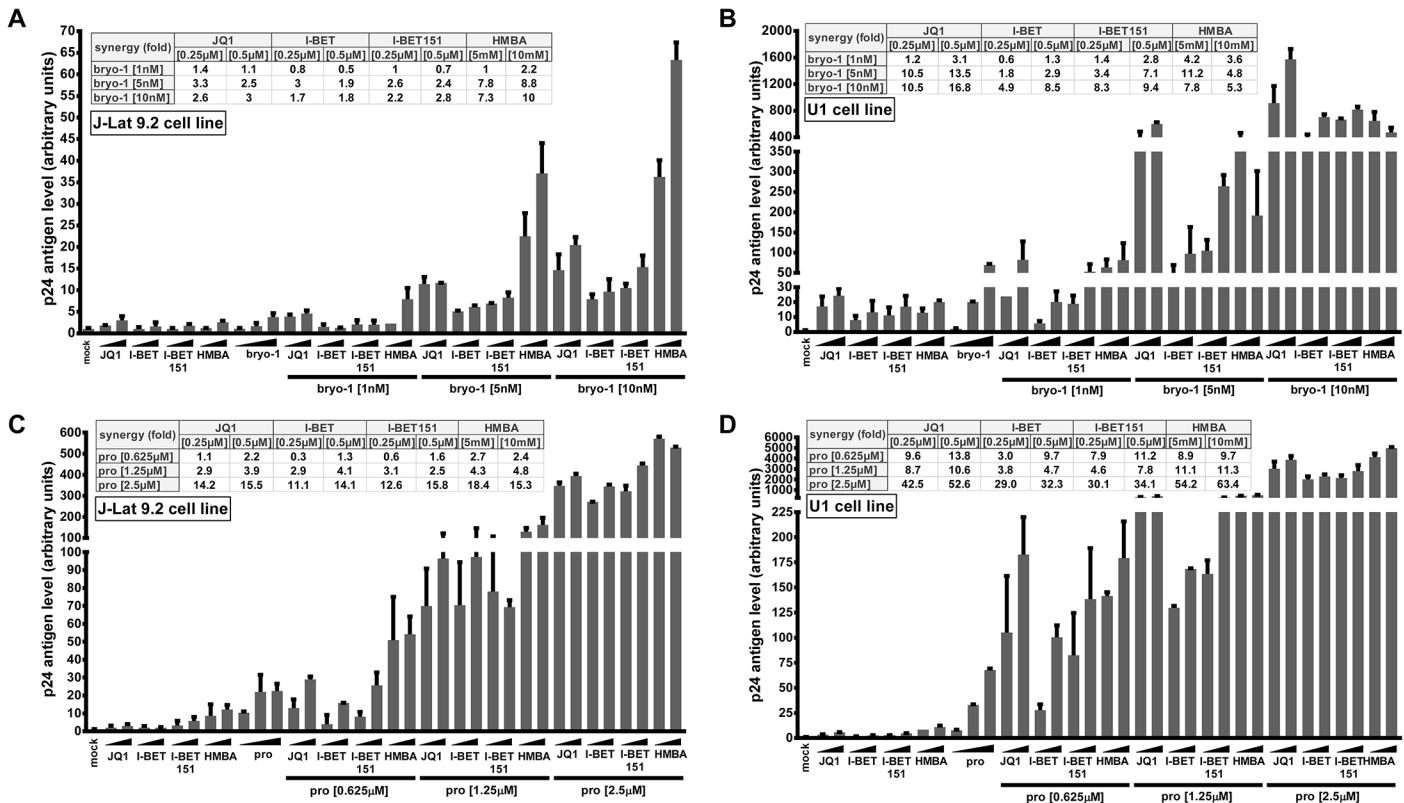


Fig 1. Compounds releasing active P-TEFb and PKC agonists act synergistically to increase HIV-1 production. J-Lat 9.2 (panels A and C) and U1 (panels B and D) cell lines were mock-treated or treated with two doses of JQ1, I-BET, I-BET151, HMBA alone or in combination with three doses of either bryostatin-1 or prostratin as indicated. At 24 hours post-treatment, viral production was estimated by measuring CA-p24 antigen concentration in culture supernatants. The mock-treated value was arbitrarily set at a value of 1. Means and standard errors of the means from duplicate samples are indicated. One representative experiment from three is represented. For each combinatory treatment, the fold-synergy was calculated by dividing the effect observed after co-treatments by the sum of the effects obtained after the individual treatments.

doi:10.1371/journal.ppat.1005063.g001

Co-treatments PKC agonist+BETi/HMBA increase HIV-1 expression in a higher proportion of cells than the drugs alone and synergistically enhance HIV-1 transcription

We next investigated whether synergistic effects in viral p24 antigen production (Fig 1) following PKC agonist+BETi/HMBA co-treatments were (i) due to an enhanced HIV-1 expression from those cells whose transcription was already reactivated by the individual drugs or (ii) due to an increase in the number of cells expressing virus. We used the J-Lat 9.2 cell line in which transcriptional activation of the latent provirus can be detected in individual cells by flow cytometry since these cells harbor full-length latent HIV-1 provirus containing *gfp* gene in place of *nef*. In the absence of stimulation, the J-Lat 9.2 cells expressed no GFP, indicating the blockade of viral transcription (Fig 2A). Treatments with each compound releasing P-TEFb used individually did not increase the number of GFP-positive cells (Fig 2A). Bryostatin-1 was weaker than prostratin in inducing GFP expression (1.3% compared to 6.3%). However, when we examined the effects of either bryostatin-1 or prostratin combined with BETi/HMBA, we observed similar synergies. The Jurkat CD4⁺ T-cell-based J-Lat clones are the most studied cellular models of HIV-1 post-integration latency. However, it is critical to address whether similar effects could be observed in other latency models of other cellular origins. For instance, microglial cells are of special importance since they represent the primary host cells for HIV in

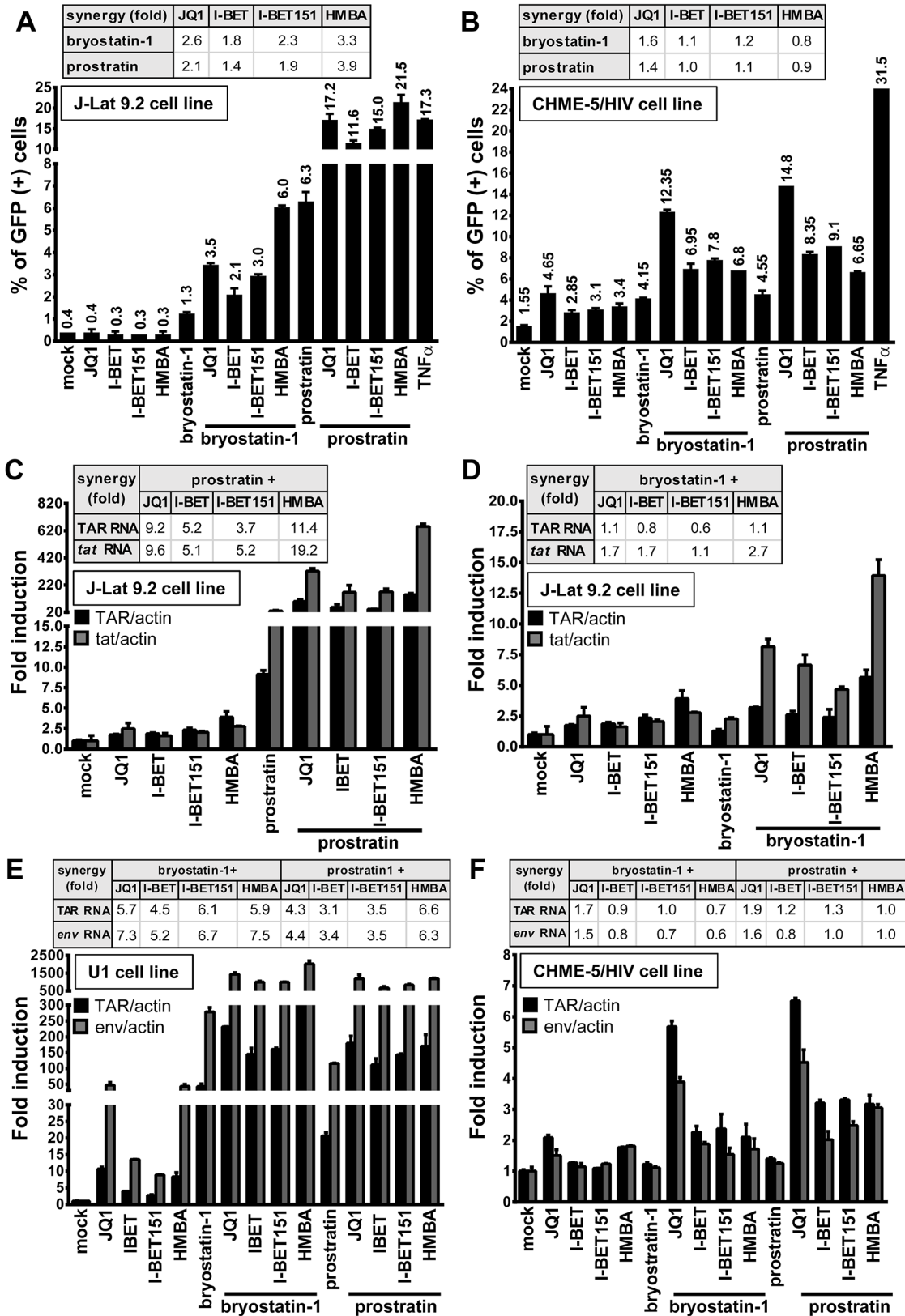


Fig 2. PKC agonist+BETi/HMBA combined treatments increase HIV-1 expression in a higher proportion of cells than the drug alone and synergistically enhance viral transcription. The J-Lat 9.2 cells (panel A) or CHME-5/HIV microglial cells (panel B) harbor latent HIV-1 provirus containing

gfp gene. The cells were mock-treated, treated with JQ1 (0.5 μ M), I-BET (0.5 μ M), I-BET151 (0.5 μ M), HMBA (5mM), bryostatin-1 (10nM) and prostratin (2.5 μ M) alone or in combination as indicated. At 24 hours post-treatment, cells were analyzed by flow cytometry to quantify the proportion of cells expressing GFP. Means and standard errors of the means from duplicate samples are indicated. One representative experiment from three is represented. For each combinatory treatment, the fold-synergy was calculated by dividing the effect observed after co-treatments by the sum of the effects obtained from individual treatments. Panels C-F. Measurement of initiated and elongated HIV-1 transcripts following drug treatment. Total RNA was extracted from J-Lat 9.2 (panels C and D), U1 (panel E), CHME-5/HIV (panel F) cells which were mock-treated or treated with BETi, HMBA, bryostatin-1 and prostratin for 24 hours at concentrations described in Fig 2A and 2B. Initiated (primers TAR) or elongated (primers *tat* or *env*) transcripts were quantified by quantitative real-time RT-PCR. Values were normalized using β -actin gene primers and were presented as fold inductions relative to the values measured in mock-treated cells, which were arbitrarily set at a value of 1. Means and standard errors of the means from duplicate samples are indicated. One representative experiment from two is represented. For each combinatory treatment, the fold-synergy was calculated by dividing the effect observed after co-treatments by the sum of the effects after the individual treatments.

doi:10.1371/journal.ppat.1005063.g002

the brain. Therefore, we took advantage of CHME-5/HIV latently infected microglial cells developed in Jonathan Karn's laboratory [41]. The CHME-5/HIV cell line containing reporter GFP was treated with prostratin, bryostatin-1, BETi and HMBA alone or in combination. JQ1 was the strongest LRA among the compounds releasing P-TEFb and activated 4.65% of cells (Fig 2B). Conversely, both bryostatin-1 and prostratin activated 4% of cells. Importantly, the proportion of GFP-positive CHME-5/HIV cells was synergistically increased by combined treatments except for the PKC agonist+HMBA and prostratin+I-BET combinations. Combinations of PKC agonist+JQ1 led to the highest synergistic increases in the percentage of GFP-positive cells (12% for bryostatin-1+JQ1 and 15% for prostratin+JQ1).

We next examined the effect of combined treatments in the THP89GFP cell line, a cell line of monocytic origin that is chronically infected with full length HIV-1 expressing GFP [42]. Similarly, we observed that combinations of bryostatin-1+JQ1 and prostratin+JQ1 led to the highest synergistic increases in percentage of GFP-positive cells (82.3% and 94.1%, respectively) (S3A Fig). We also detected synergistic increases in J-Lat cell lines harboring a latent lentiviral construct expressing GFP and expressing or lacking Tat (A2 and A72, respectively) (S3B and S3C Fig, respectively). Thus, our data, in various latency models of T-lymphocytic (J-Lat 9.2, A2 and A72) and myeloid (CHME-5/HIV, THP89GFP) origins, demonstrated that co-treatments of PKC agonist+BETi/HMBA produced an increase in the number of cells expressing virus. We also compared the mean fluorescence intensities (MFI) of the GFP-positive populations following the PKC agonist+BETi/HMBA treatments (S4A–S4C Fig) and we showed that the amount of GFP produced per cell was also synergistically increased. These data showed that synergy was due to both an increase in the number of cells expressing virus and an enhanced HIV-1 gene expression.

Next, we investigated whether the synergistic effects described above were due to enhanced HIV-1 transcription. To this end, we treated J-Lat 9.2 cells with compounds alone or in combination and we quantified initiated and elongated HIV-1 transcripts by quantitative RT-PCR. Combination prostratin+BETi/HMBA produced synergistic increases in relative amounts of both initiated (TAR probe) and elongated (*tat* probe) viral transcripts (Fig 2C). Bryostatin-1 was weaker than prostratin in producing synergistic effects (Fig 2D). In addition, synergistic increases in both initiated (TAR probe) and elongated (*env* probe) viral transcripts were observed in the U1 monocytic cell line (Fig 2E). In CHME-5/HIV microglial cells, synergies were observed for initiated and elongated viral transcripts only for the PKC agonist+JQ1 combinations (Fig 2F), correlating with the data we obtained by flow cytometry (compare Fig 2B and 2F). JQ1 was shown by others to exhibit a good distribution into tissue compartments such as brain and testis which are known HIV-1 sanctuaries [43]. These properties of JQ1 and its ability to reactivate the virus in microglial cells suggest JQ1 as an interesting compound for targeting latent virus in those reservoirs. Importantly, unlike in J-Lat 9.2 cells, in U1 and CHME-5/HIV cells, synergistic effects caused by bryostatin-1 were similar to those caused by

prostratin, indicating that combinations can present cell type-dependent specificity and underlying the importance of testing LRAs in various cellular models of HIV-1 latency models of different cellular origins.

Together, our data demonstrated that co-treatments prostratin/bryostatin-1+ BETi/HMBA resulted in diverse synergies that seemed cell-type specific. Moreover, in all cell lines tested, combined treatments PKC agonists+JQ1 were the most potent combinations and increased viral transcripts levels and percentage of activated cells. Combinations of prostratin/bryostatin-1+HMBA led to similar strong synergistic effects, except for treatments in CHME-5/HIV microglial cells.

The combined treatments have a higher potential than the individual drug treatments in reactivating HIV-1 in CD8⁺-depleted PBMCs and in resting CD4⁺ T cells from cART-treated HIV⁺ aviremic patients

In vitro models for HIV-1 latency do not necessarily recapitulate the events occurring during viral latency *ex vivo* [44]. Above we showed high potential in viral reactivation of treatments combining PKC agonists and P-TEFb-releasing agents *in vitro* in HIV-1 latency models of lymphoid and myeloid cell origins. We next determined whether the combined treatments also correlated with HIV-1 recovery in *ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs and resting CD4⁺ T cells isolated from cART-treated aviremic HIV-1⁺ patients. Firstly, we evaluated cellular viability in CD8⁺-depleted PBMCs cultures purified from blood of 5 uninfected donors following drug treatments (S5 Fig). BETi, HMBA and bryostatin-1 did not alter cellular metabolic activity at any concentration tested. However, we observed a dose-dependent decrease in metabolic activity in prostratin-treated CD8⁺-depleted PBMCs with a metabolic activity of 25% for the above used prostratin concentration (2.5μM). Therefore, we chose for further experiments a dose of prostratin (0.5μM) presenting a cellular metabolic activity of 60%. In order to evaluate HIV-1 recovery, CD8⁺-depleted PBMCs purified from blood of 24 cART-treated HIV⁺ aviremic patients were mock-treated, treated with anti-CD3+anti-CD28 antibodies as a positive control for global T cell activation or with indicated LRAs (Fig 3A, Fig 4 and S1 Table). Cell-associated total HIV-1 DNA and extracellular viral RNA were quantified. The number of proviruses seeded in each well was estimated from the number of HIV-1 DNA copies/10⁶ cells determined by qPCR assuming negligible unintegrated HIV-1 DNA in patients after long-term cART [8]. Measurements of extracellular HIV RNA represents a surrogate marker for virions release from treated cell cultures. Indeed, Mellors' group has highlighted the necessity to measure viral production and not only unspliced cellular HIV-1 RNA following HIV-1 reactivation since these authors did not observe significant correlation between these two methods after treatment with an other LRA, the HDACi, SAHA [45]. We assumed that extracellular virions would accumulate over the course of several days; therefore, the duration of culture was extended to 6 days to maximize assay sensitivity.

We detected HIV-1 RNA in 2 out of 24 patient's cultures (8%) in mock-treated conditions. This phenomenon could be explained by the stochastic distribution of HIV⁺ cells in the population of isolated cells and by the activation of those HIV⁺ cells during the experiment. I-BET led to reactivation of 61% of the patient cell cultures (Fig 4) and caused an increase in recovered viral genomic RNA (mean of 601 HIV-1 RNA copies/ml). JQ1 led to reactivation of 57% of the patient cell cultures (Fig 4) and caused an increase in recovered viral genomic RNA (mean of 461 HIV-1 RNA copies/ml). I-BET151 and HMBA increased the percentage of reactivated cultures (50 and 42%, respectively) and the mean levels of extracellular HIV-1 RNA were 478 and 391 HIV RNA copies/ml, respectively (Fig 4). Bryostatin-1 was more potent than prostratin and led to reactivation of 67% of cultures when the latter reactivated 46% of cultures.

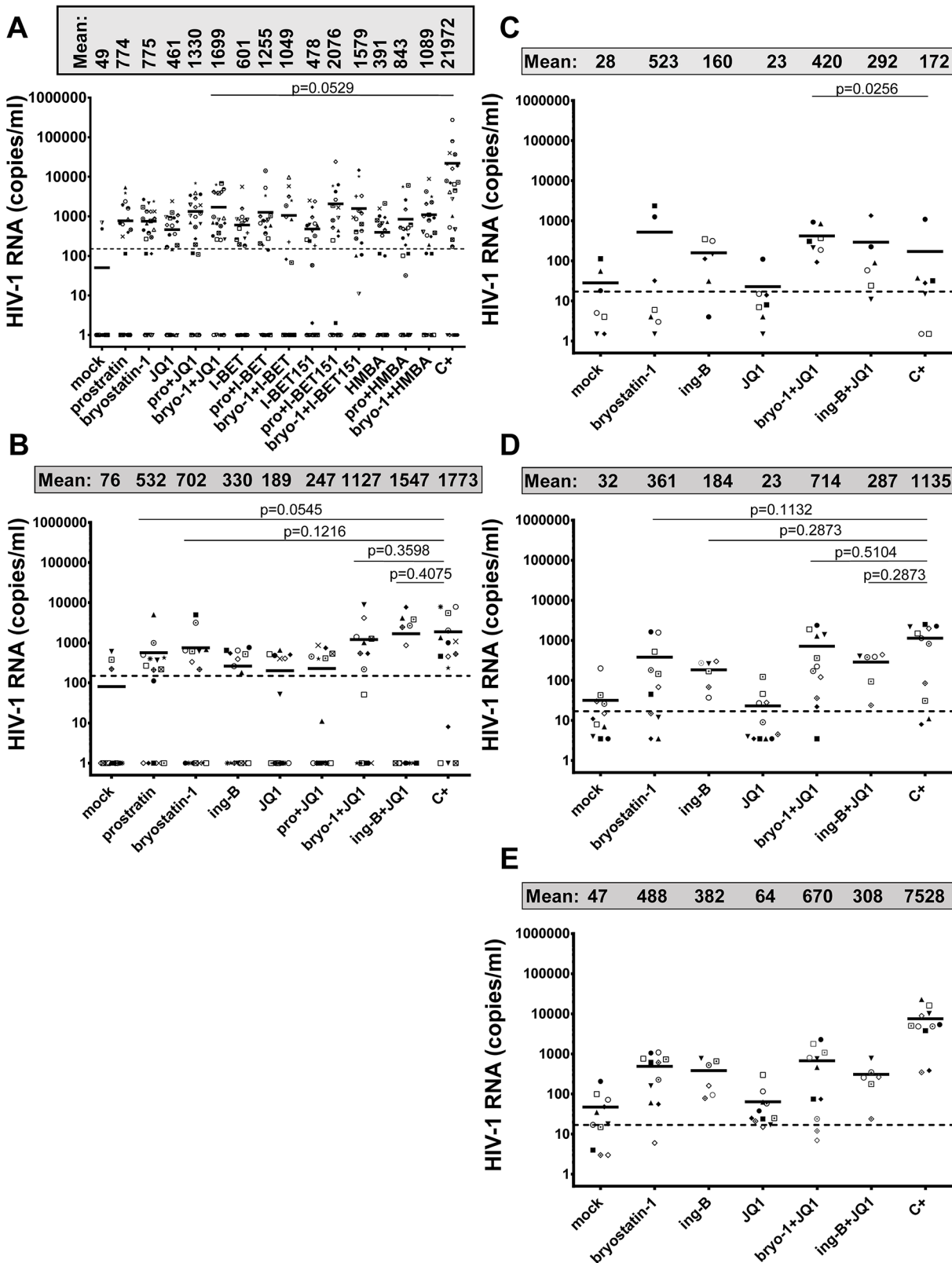


Fig 3. PKC agonists and compounds releasing active P-TEFb induce HIV-1 recovery in CD8⁺-depleted PBMCs and in resting CD4⁺ T cells from cART-treated HIV⁺ aviremic patients. Panel A. *Ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs purified from blood of 24 patients were mock-treated, treated with

anti-CD3+anti-CD28 antibodies (C+), prostratin (0.5µM), bryostatin-1 (5nM), JQ1 (0.25µM), I-BET (0.25µM), I-BET151 (0.25µM) or HMBA (5mM) alone or in combination as indicated. Six days post-treatment, concentrations of genomic viral RNA were measured in culture supernatants. Statistical comparisons to positive control are indicated if p<0.05 (superiority to positive control). Panel B. *Ex vivo* cultures of resting CD4⁺ T cells purified from blood of 15 patients were mock-treated, treated with anti-CD3+anti-CD28 antibodies (C+), prostratin (0.5µM), bryostatin-1 (5nM), ing-B (10nM), JQ1 (0.25µM), alone or in combination as indicated. Six days post-treatment, concentrations of genomic viral RNA in culture supernatants were determined. Statistical comparisons to positive control are indicated if p>0.05 (non-inferiority). Panels A and B. Dashed line indicates the 150 HIV-1 RNA copies/ml limit of detection. Panel C. *Ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs purified from blood of 7 HIV⁺ patients were mock-treated, treated with anti-CD3+anti-CD28 antibodies (C+), bryostatin-1 (5nM), JQ1 (0.25µM) or ing-B (10nM) alone or in combination in the presence of cART. One day post-treatment, concentrations of genomic viral RNA in culture supernatants were determined. Statistical comparisons to positive control are indicated if p<0.05 (superiority to positive control). Panel D. *Ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs purified from blood of 11 HIV⁺ patients were mock-treated, treated with anti-CD3+anti-CD28 antibodies (C+), bryostatin-1 (5nM), JQ1 (0.25µM) or ing-B (10nM) alone or in combination in the presence of cART. Three days post-treatment, concentrations of genomic viral RNA in culture supernatants were determined. Statistical comparisons to positive control are indicated if p>0.05 (non-inferiority to positive control). Panel E. *Ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs purified from blood of 11 HIV⁺ patients were mock-treated, treated with anti-CD3+anti-CD28 antibodies (C+), bryostatin-1 (5nM), ing-B (10nM) or JQ1 (0.25µM) alone or in combination in the presence of cART. Six days post-treatment, concentrations of genomic viral RNA in culture supernatants were determined. Statistical comparisons to positive control are not indicated because p<0.05 for all the conditions (superiority of the positive control). Panels C-E. Dashed line indicates the 15 HIV-1 RNA copies/ml limit of detection. Panels A-E. Each symbol represents one cART-treated HIV⁺ patient. The means are represented.

doi:10.1371/journal.ppat.1005063.g003

Bryostatin-1 and prostratin produced similar increases in viral RNA levels (mean of 755 HIV-1 RNA copies/ml and of 774 HIV-1 RNA copies/ml, respectively). Combined treatments of prostratin+BETi/HMBA produced increases in the percentage of reactivated cultures as compared to individual drug treatments (Fig 4). Among the bryostatin-1 combined treatments,

Patient	Total HIV-1 DNA (copies/10 ⁶ PBMCs)	Log Total HIV-1 DNA (copies/10 ⁶ PBMCs)	Mock	JQ1	I-BET	I-BET151	HMBA	pro	prostratin				bryo-1	bryostatin-1				C+	
									JQ1	I-BET	I-BET151	HMBA		JQ1	I-BET	I-BET151	HMBA		
P1	680	2.83		340			1016	669	3591		4200	282	449	318					
P2	1217	3.09				237													
P3	70	1.85				584	717	5359	694	585	435		657	691	830			191	1017
P4	350	2.54		729	//	1707	944	394	271	531	316	187		670		14741	308	7027	
P5	1782	3.25			812			3870	6857	3328	5876	5563	2381	6307	2496	10158	3142	20524	
P6	669	2.83		2418	5579	2505	1582	308	1918	774	1666	472	1336	3936	5741	936	8798	39773	
P7	670	2.83		//			586	459	536		797	//	296	566		274	2274	36562	
P8	782	2.89		576	964	650		2377		665		512		253		851	329	526	
P9	847	2.93			490	257				273	247		265	261				6468	
P10	345	2.54			278	619			645			334	2153	264					
P11	1435	3.16		604	784	2380			1699		24068	485	1304	4099	962	3274	1007	16036	
P12	947	2.98		357			325	627	967	5251	2636							273634	
P13	253	2.40			381	181				185					224	3194			
P14	1823	3.26		185	195		789		193	206			766	380		634	382	257	
P15	390	2.59		167	181			1594		370			377				790	172	
P16	340	2.53		901	257							608		6835		403		4506	
P17	263	2.42						849	3920				459	898	9752			4119	
P18	333	2.52		1064	1579	953	451		2834	1002	517	1502	883	4161	3171	1190	2056		
P19	187	2.27										520	1330	4880		428		79344	
P20	1236	3.09	481	914				1949	3393	783	6281	2597	2669	655		212	916	19029	
P21	600	2.78	693	954	846				1039		918			814				2717	
P22	737	2.87				319			1190	14170			869	965	1855	1395	4230	7879	
P23	380	2.58		1239	647		2106			1032	1870	6074	1702	3833				1092	7267
P24	203	2.31			815	430	662		1956	813							402	464	
# activated patient cell cultures	2	13	14	12	10	11	16	15	13	12	16	19	8	13	14	19			
# analyzed patient cell cultures	24	23	23	24	24	24	24	24	24	23	24	24	24	24	24	24			
% activated patient cell cultures	8	57	61	50	42	46	67	63	54	52	67	79	33	54	58	79			

Fig 4. PKC agonists and compounds releasing active P-TEFb induce HIV-1 recovery in CD8⁺-depleted PBMCs from cART-treated HIV⁺ aviremic patients. *Ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs purified from blood of 24 patients were mock-treated or treated with anti-CD3+anti-CD28 antibodies, prostratin (0.5µM), bryostatin-1 (5nM), JQ1 (0.25µM), I-BET (0.25µM), I-BET151 (0.25µM) or HMBA (5mM) alone or in combination as indicated. Six days post-treatment, concentrations of genomic viral RNA in culture supernatants were determined and the values were expressed as HIV-1 RNA copies/ml. Total HIV-1 DNA was expressed as HIV-1 DNA copies/10⁶ CD8⁺-depleted PBMCs. Values representing higher viral production after the combined treatment than after the single drug treatments are shown in grey. Values representing reactivation of the virus observed exclusively after combined treatments are shown in black. '|' indicates below the 150 HIV-1 RNA copies/ml limit of detection. '/' indicates not tested conditions.

doi:10.1371/journal.ppat.1005063.g004

only bryostatin-1+JQ1 produced an increase in percentage of activated cultures. From the combined treatments tested, prostratin+JQ1 and bryostatin-1+JQ1 presented the highest percentages of reactivated cultures (67 and 79%, respectively). Importantly, HIV-1 recovery obtained after bryostatin-1+JQ1 co-treatment (79%) reached the same percentage increase as the one obtained with the positive control (79%). Notably, all combinations of PKC agonist+compound releasing P-TEFb produced higher mean levels of extracellular HIV-1 RNA than the mean levels obtained with individual drug treatments (Fig 3A). We performed statistical analysis of the reactivation levels observed after individual and combined treatments compared to the level observed after anti-CD3+anti-CD28 stimulation (Fig 3A). Remarkably, the level obtained after the combination bryostatin-1+JQ1 was the only one to exhibit statistical non-inferiority to the positive control level (Fig 3A, $p>0.05$). This result confirmed the potency we demonstrated in Fig 4 in terms of frequency of reactivated patient cell cultures.

In addition to the increases in the reactivation frequency and in mean extracellular HIV-1 RNA levels, we demonstrated a higher viral production in several cell cultures following combined treatments. For instance, as shown in Fig 4, HIV-1 recovery was only observed with the combination but not with the two drugs used separately (Fig 4, see black boxes). Moreover, in several *ex vivo* cultures, combined treatments allowed higher levels of viral production than the levels observed with the individual treatments (Fig 4, see grey boxes).

Among the cell types present in CD8⁺-depleted PBMCs, latently infected resting CD4⁺ T cells represent the major reservoir of HIV infection. We therefore evaluated the reactivation potential of individual and combined treatments in this cell type. Fig 3A and Fig 4 showed that PKC agonist+JQ1 co-treatments led to (i) the highest percentages of reactivated patient cell cultures and (ii) important increases in extracellular viral RNA compared to other PKC agonist+BETi/HMBA co-treatments in CD8⁺-depleted PBMCs purified from blood of cART-treated HIV⁺ aviremic patients. Therefore, we evaluated in resting CD4⁺ T cells the reactivation potentials of JQ1 alone or combined with either prostratin or bryostatin-1 or another PKC agonist, ing-B. Indeed, while we were performing this study, ing-B has been reported to potently reactivate latent HIV-1 [25,26] *in vitro* and we decided to evaluate here its potential *ex vivo*. We isolated HLA-DR⁻, CD69⁻, CD25⁻ CD4⁺ T cells from blood of 15 cART-treated HIV⁺ aviremic patients. *Ex vivo* cell cultures were mock-treated, treated with anti-CD3+anti-CD28 antibodies or with the compounds of interest (Fig 5 and S1 Table). Cell-associated total HIV-1 DNA and extracellular viral RNA were quantified. We detected HIV-1 RNA in 3 out of 15 patient's cultures (20%) in mock-treated conditions. Prostratin, bryostatin-1, ing-B, and JQ1 reactivated latent HIV-1 in 60%, 53%, 53%, and 40% of the cultures, respectively (Fig 5). All individual treatments produced increases in mean HIV-1 RNA copies/ml levels that were higher than the 150 copies/ml threshold (Fig 3B). Notably, the combination bryostatin-1+JQ1 and ing-B+JQ1 produced higher increases in mean viral RNA levels relative to the individual treatments. These bryostatin-1+JQ1 and ing-B+JQ1-induced increases reached 1127 and 1547 HIV-1 RNA copies/ml, respectively (Fig 5). Importantly, the very high levels of reactivated virus following those treatments were statistically non-inferior ($p>0.05$) to the level obtained after anti-CD3+anti-CD28 stimulation. In contrast, we did not observe any benefit of combining prostratin with JQ1. All the combined treatments did not increase the frequency of reactivated patient cell cultures relative to the individual treatments, but synergistically increased HIV-1 recovery in most of the cultures (Fig 5, see black and grey boxes). For instance, the ing-B+JQ1 co-treatment led to reactivation in 46% of *ex vivo* cultures and, remarkably, all these cultures exhibited strong synergistic increases. Of note, we also performed individual and combined treatments using ing-B in CD8⁺-depleted PBMCs from cART-treated HIV⁺ aviremic patients and we observed strong reactivations of latent HIV-1. This part of our work concerning ing-B

Patient	Total HIV-1 DNA (copies/10 ⁶ resting CD4 ⁺ T cells)	Log Total HIV-1 DNA (copies/10 ⁶ resting CD4 ⁺ T cells)	Mock	JQ1	pro	bryo-1	ing-B	JQ1			C+
								pro	bryo-1	ing-B	
P36	1200	3.08	I	483	I	I	764	I	I	I	1002
P37	1179	3.07	I	I	I	4982	648	I	I	I	460
P38	112	2.05	I	649	5022	676	180	I	1007	4131	1337
P39	4414	3.64	I	503	I	I	545	741	540	7687	I
P40	1777	3.25	I	403	I	I	I	860	I	I	1077
P41	5220	3.72	I	I	497	642	643	I	1399	//	7868
P42	911	2.96	I	522	268	I	I	I	I	I	I
P43	3841	3.58	607	I	369	624	I	538	8858	//	I
P44	946	2.98	I	405	I	333	392	I	4155	860	453
P45	525	2.72	I	I	400	I	I	I	I	I	7880
P46	1523	3.18	I	I	423	I	I	401	I	I	235
P47	9248	3.97	I	I	994	3148	261	453	I	2677	2018
P48	4849	3.69	377	I	I	609	521	412	I	3839	5497
P49	1177	3.07	221	I	210	218	I	I	543	2452	525
P50	758	2.88	I	I	218	I	I	533	1259	I	I

# reactivated patient cell cultures	3	6	9	8	8	7	7	6	11
# analyzed patient cell cultures	15	15	15	15	15	15	15	13	15
% activated patient cell cultures	20	40	60	53	53	47	47	46	73

Fig 5. PKC agonists and JQ1 induce HIV-1 recovery in resting CD4⁺ T cells from cART-treated HIV⁺ aviremic patients. *Ex vivo* cultures of resting CD4⁺ T cells purified from blood of 15 patients were mock-treated or treated with anti-CD3+anti-CD28 antibodies, JQ1 (0.25µM), prostratin (0.5µM), bryostatin-1 (5nM) or ing-B (10nM) alone or in combination as indicated. Six days post-treatment, concentrations of viral RNA in culture supernatants were determined and the values were expressed as HIV-1 RNA copies/ml. Total HIV-1 DNA was expressed as HIV-1 DNA copies/10⁶ resting CD4⁺ T cells. Values representing higher viral production after a combinatory treatment than after the corresponding single drug treatments are shown in grey. Values representing reactivation of viral production observed exclusively after combined treatment are shown in black. 'I' indicates below the 150 HIV-1 RNA copies/ml limit of detection. '/' indicates not tested conditions.

doi:10.1371/journal.ppat.1005063.g005

individual treatment of patient cell cultures will be reported in a separate study (L. Gama and colleagues, manuscript in preparation).

Consequently, our results established that PKC agonists acted as powerful LRAs and that their reactivation properties were potentiated when used in combination with P-TEFb-releasing agents, especially JQ1. However, it should be noted that we did not observe viral reactivation either after individual, combined or anti-CD3+anti-CD28 treatments in all the patient cell cultures. This observation can be explained by the multifactorial and stochastic nature of viral latency but also by the very low frequency of latently infected cells carrying replication competent proviruses. Indeed, in the experiments described above, we plated 6 million CD8⁺-depleted PBMCs or 0.5 million resting CD4⁺ T cells per culture condition. Assuming the scarcity of latently-infected cells, it is possible that some of the experimental wells did not contain any reservoir. Moreover, we used a reactivation system without cART in order to increase the sensitivity of our assays since it allowed infection of new cells and multiple viral cycles. Nevertheless, it may have introduced a bias since the compounds used may have sensitized bystander cells to new infections. Based on the results presented in Fig 3A and 3B, we thus selected the most potent drug combinations (bryostatin-1+JQ1 and ing-B+JQ1) and tested them in the presence of cART. We plated 12 million of CD8⁺-depleted PBMCs in order to increase the number of latently infected cells per tested condition. Moreover, we looked at the effect of the drugs not

Patient	Total HIV-1 DNA (copies/10 ⁶ PBMCs)	Log Total HIV-1 DNA (copies/10 ⁶ PBMCs)	Day 1							Day 3							Day 6						
			Mock	JQ1	bryo-1	ing-B	bryo-1 +JQ1	ing-B +JQ1	C+	Mock	JQ1	bryo-1	ing-B	bryo-1 +JQ1	ing-B +JQ1	C+	Mock	JQ1	bryo-1	ing-B	bryo-1 +JQ1	ing-B +JQ1	C+
P25	1750	3.24							I	I	1630	//	2370	//	2255	207	38	1053	//	2280	//	5400	
P26	380	2.58							I	I	45	//	I	//	2495	I	24	610	//	75	//	3803	
P27	1010	3.00							I	I	I	//	1275	//	I	35	63	60	//	461	//	22775	
P28	443	2.65							I	I	I	//	22	//	I	48	25	56	//	75	//	386	
P29	907	2.96	55	I	I	31	844	89	37	I	I	I	262	1394	402	2189	18	17	161	774	769	780	10200
P30	843	2.93	18	110	1256	I	929	225	1090	199	27	1567	37	222	387	1127	72	116	1090	95	805	257	4855
P31	2693	3.43	113	I	2361	//	306	//	32	I	46	522	//	1883	//	1489	100	299	762	//	1780	//	16200
P32	723	2.86	I	I	I	147	213	I	I	30	I	I	68	36	24	85	I	21	612	79	I	24	349
P33	830	2.92	I	I	32	112	93	1344	28	I	28	68	297	121	437	1972	I	15	I	161	I	263	8945
P34	1187	3.07	I	I	I	350	368	24	I	43	123	145	169	361	94	31	15	25	736	656	1081	177	5015
P35	677	2.83	I	I	I	313	187	58	I	26	I	181	271	171	379	820	17	58	227	527	24	349	4875

# reactivated patient cell cultures	3	1	3	5	7	5	4	11	11	11	6	11	6	11	11	11	11	6	11	6	11
# analyzed patient cell cultures	7	7	7	6	7	6	7	4	4	7	6	10	6	9	8	11	10	6	9	6	11
% activated patient cell cultures	43	14	43	83	100	83	57	36	36	64	100	91	100	82	73	100	91	100	82	100	100

Fig 6. PKC agonists and JQ1 induce HIV-1 recovery in CD8⁺-depleted PBMCs from cART-treated HIV⁺ aviremic patients in the presence of cART. *Ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs purified from blood of 11 patients were mock-treated or treated with anti-CD3+anti-CD28 antibodies, JQ1 (0.25µM), bryostatin-1 (5nM) or ing-B (10nM) alone or in combination as indicated. Concentrations of viral RNA in culture supernatants were determined one day, three days or six days post-treatment. The values were expressed as HIV-1 RNA copies/ml. Total HIV-1 DNA was expressed as HIV-1 DNA copies/10⁶ CD8⁺-depleted PBMCs. Values representing higher viral production after a combinatory treatment than after the corresponding single drug treatments are shown in grey. Values representing reactivation of virus production observed exclusively after combined treatments are shown in black. 'I' indicates below the 15 HIV-1 RNA copies/ml limit of detection, '/' indicates not tested conditions.

doi:10.1371/journal.ppat.1005063.g006

only at day 6 but also at day 1 and day 3 of culture. Of note, continuous bryostatin-1 infusion of 24 hours [46] and 72 hours [47] were previously tested in patients affected by malignancies.

At day 1 (Fig 6 and S1 Table), the combination bryostatin-1+JQ1 was the only condition that caused viral reactivation in the cell cultures from 7 patients tested (100% of reactivation). Surprisingly, this combined treatment exceeded the effect observed after anti-CD3+anti-CD28 stimulation (p = 0.0256) (Fig 3C). The combination ing-B+JQ1 reactivated latent HIV-1 in 83% of cultures, a result identical to that observed with ing-B alone and that exceeded the percentage obtained after stimulation with the positive control (57%) (Fig 6). Importantly, this ing-B+JQ1 combination resulted in a higher mean level of extracellular HIV-1 RNA than the mean level obtained with ing-B alone (mean of 292 HIV-1 RNA copies/ml and of 160 HIV-1 RNA copies/ml, respectively) (Fig 3C).

At day 3 (Fig 6 and S1 Table), the combination bryostatin-1+JQ1 reactivated HIV-1 in 10 out of 11 patient cultures (91% of reactivated patient cell cultures). This percentage was thus higher than percentages obtained after treatment with bryostatin-1 alone (64%) or after the positive control stimulation (82%). The conditions ing-B alone and ing-B+JQ1 reactivated HIV-1 in 100% of the *ex vivo* cultures. Similarly to the results obtained at day 1, ing-B+JQ1 combination resulted in a higher mean level of extracellular HIV-1 RNA than the mean level obtained with ing-B alone (mean of 287 HIV-1 RNA copies/ml and of 184 HIV-1 RNA copies/ml, respectively) (Fig 3D). As indicated in Fig 3D, the levels observed after the individual PKC agonist treatments and after the combinations PKC agonists+JQ1 were at day 3 statistically non-inferior (p>0.05) to the level obtained after anti-CD3+anti-CD28 stimulation.

At day 6 (Fig 3E, Fig 6 and S1 Table), the sensitivity of the RNA quantification allowed us to detect a viral production at very low level even in the mock-treated cultures, probably due to the activation of HIV⁺ cells during the experiment. It is consequently difficult to discuss the percentages of reactivation observed. The combination bryostatin-1+JQ1 produced a higher mean level of extracellular HIV-1 RNA than the mean level obtained with bryostatin-1 alone (mean of 670 HIV-1 RNA copies/ml and of 382 HIV-1 RNA copies/ml, respectively),

confirming in the presence of cART the results presented in [Fig 3A](#) in the absence of cART. The combination ing-B+JQ1 produced a slightly lower mean level of extracellular HIV-1 RNA than the mean level obtained with ing-B alone. At day 6, the positive control treatment showed a statistical superiority to all the tested conditions. Indeed, unlike the stimulation by the LRAs, the stimulation by the positive control relied on continuous cell stimulation arising from coated anti-CD3 antibodies. This could explain that the level of extracellular genomic viral RNA was increasing in a time-dependent manner. On the contrary, the maximal effect of the bryostatin-1+JQ1 and ing-B+JQ1 combinations appeared earlier (at day 3 and day 1, respectively). Importantly, the kinetics of the effect observed with bryostatin-1 corresponded to its clinical use [46,47]. Interestingly, JQ1 did not lead to a significant viral reactivation in the presence of cART ([Fig 3C–3E](#)), probably because the reactivation potential of this LRA is weak when used alone and needs to be amplified in order to be detected.

Moreover, we evaluated the cell viability for PKC agonist+JQ1 combinations in CD8⁺-depleted PBMCs isolated from blood of uninfected donors and we showed that prostratin +JQ1, bryostatin-1+JQ1 and ing-B+JQ1 combinations presented 82%, 62% and 69% of cellular metabolic activity, respectively ([S6A Fig](#)) and caused no cell death ([S6B Fig](#)).

Finally, in order to verify that the reactivated viruses were infectious, we performed infections of Jurkat cells with viruses isolated from bryostatin-1+JQ1 treated patient cell cultures and demonstrated the infectivity of the reactivated viruses ([S2 Table](#)).

In conclusion, our results established that PKC agonists acted as powerful LRAs and that their reactivation properties were potentiated when used in combination with compounds releasing P-TEFb and thereby increasing transcriptional elongation, especially JQ1. Importantly, HIV-1 reactivation potencies of these combinations were already clearly detected at 24 hours post-treatment.

Synergistic HIV-1 recovery following PKC agonist+BETi/HMBA combined treatments is dependent on NF-κB

We assessed the molecular mechanisms underlying the synergistic induction of HIV-1 observed at the viral RNA and protein levels following individual or combined treatments with PKC agonists and BETi/HMBA ([Figs 1–6](#)). Firstly, we evaluated the involvement of two NF-κB binding sites located in the enhancer region of the HIV-1 promoter. We transiently transfected Jurkat cells either with episomal vector driving the luciferase expression from wild-type LTR (LTRwt-luc) or with similar reporter vector mutated in two NF-κB binding sites located in HIV LTR (LTR-NFκBmut-luc). Cells were stimulated with JQ1, I-BET, I-BET151, HMBA, prostratin, and bryostatin-1 alone or in combination. Combinations of PKC agonist+BETi/HMBA led to synergistic increases in luciferase activity arising from LTRwt-luc transfection ([Fig 7A](#)). We observed that lack of the two NF-κB binding sites located in HIV-1 LTR impaired the synergistic increase in luciferase activity following combined treatments. These data indicated the involvement of NF-κB protein binding to the viral promoter in the PKC agonist+BETi/HMBA synergies. To assess the effect of the drugs on the NF-κB binding activity, we next performed electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) using an HIV-1 NF-κB probe and nuclear extracts from Jurkat T cells stimulated for various periods of time with JQ1, bryostatin-1 or bryostatin-1+JQ1 ([Fig 7B](#)). We detected an induction of NF-κB DNA-binding activity in response to a 60 min treatment with bryostatin-1 ([Fig 7B](#), lane 7). JQ1 alone caused no induction of NF-κB binding activity even after a 240 min treatment ([Fig 7B](#), lanes 2, 6, 10 and 14). When bryostatin-1 was combined with JQ1, an induction of NF-κB binding activity stronger than that obtained with bryostatin-1 alone was observed at 60 and 120 min time points ([Fig 7B](#), compare lane 7 with lane 8 and lane 11 with lane 12). This effect faded away at 240 min time point, confirming transient NF-κB DNA-binding

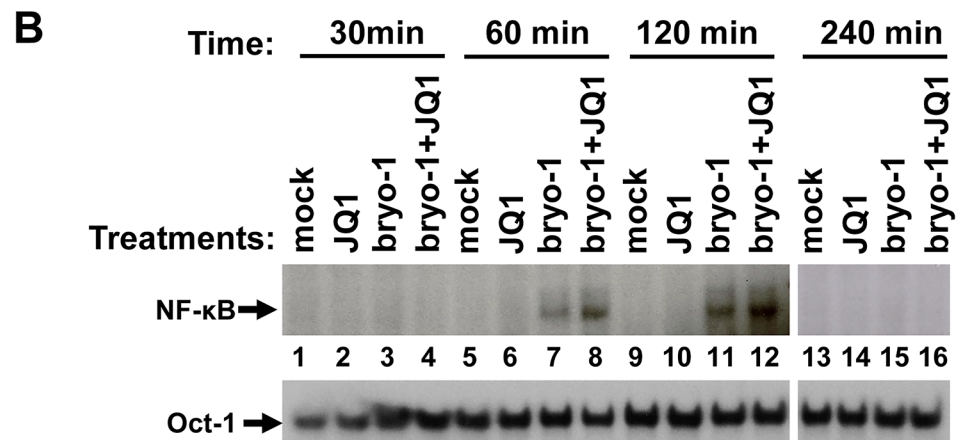
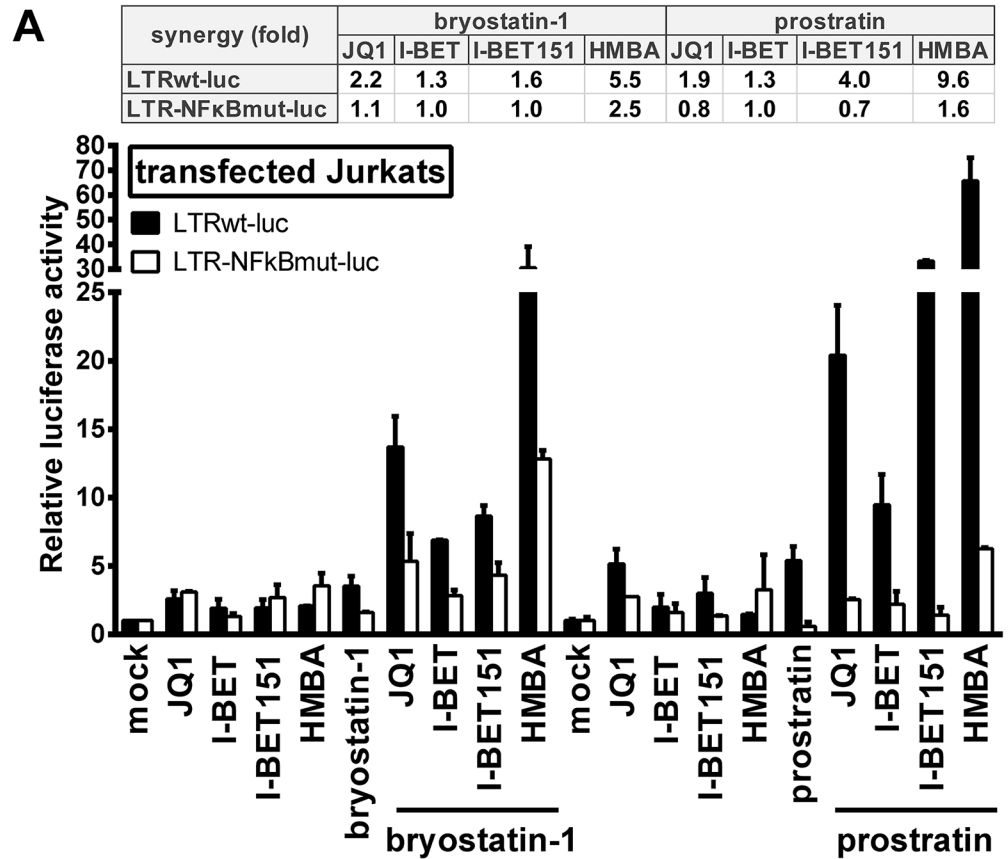


Fig 7. Synergistic inducibility of HIV-1 LTR promoter by PKC agonist+BETI/HMBA combinatory treatments depends on NF-κB. Panel A. Jurkat cells were transiently transfected with the episomal plasmid containing the luciferase reporter gene driven either by the wild-type HIV LTR promoter (LTRwt-luc) or by the LTR promoter mutated in the two NF-κB binding sites (LTR-NFκBmut-luc). Twenty-four hours later, cells were mock-treated, treated with JQ1 (0.5μM), I-BET (0.5μM), I-BET151 (0.5μM), HMBA (5mM), bryostatin-1 (10nM) and prostratin (2.5μM) alone or in combination. Luciferase activities in cell extracts were measured 24 hours after drug treatments and reported as fold increases over the activity observed in mock-treated conditions (transfection of the reporter plasmid without drug treatment) and arbitrarily set at values of 1. An experiment performed in triplicates representative of two independent experiments is shown. Panel B. Nuclear extracts were prepared from Jurkat cells which were mock-treated, treated with bryostatin-1 (10nM), JQ1 (0.5μM) or with bryostatin-1+JQ1 for different time periods. An oligonucleotide corresponding to the HIV-

1 LTR NF- κ B sites was used as probe in EMSAs. As control for equal loading, the bottom panel shows comparability of the various nuclear extracts assessed by EMSA with an Oct-1 consensus probe.

doi:10.1371/journal.ppat.1005063.g007

activity. Our results demonstrated that JQ1 increased bryostatin-1-induced NF- κ B DNA-binding activity. This could explain, at least in part, the synergistic increases in HIV transcription following combined treatments observed in [Fig 2](#).

In conclusion, our data indicated that the synergistic activation of HIV-1 obtained after PKC agonist+BETi/HMBA combinationed cellular treatments was, at least in part, dependent on NF- κ B.

Bryostatin-1+JQ1 combination has a higher potential in activating P-TEFb than the individual drug treatments

To address the molecular mechanisms mediating the synergistic activation of HIV-1 transcription and production following the combined bryostatin-1+JQ1 treatment, we investigated the effect on P-TEFb release of these LRAs alone or in combination. To this end, Jurkat cells were treated with JQ1, bryostatin-1 or a combination of both compounds for 1 hour and 24 hours. Nuclear extracts were prepared from treated cells and were used to perform immunoprecipitation experiments targeting CDK9 and Western blotting addressing the interaction of CDK9 with either HEXIM1 or CycT1. As shown in [Fig 8A](#), for the 1 hour treatment, our results demonstrated a transient release of HEXIM1 from the CDK9/CycT1 (P-TEFb) complex after JQ1 treatment. These data are in agreement with a previous report from Peterlin and colleagues [31]. Bryostatin-1 treatment caused a weaker release of HEXIM1 from the P-TEFb complex than the JQ1 treatment ([Fig 8A](#), compare lane 8 with lane 9). Interestingly, the combined treatment bryostatin-1+JQ1 led to a much stronger and synergistic HEXIM1 release than the individual treatments. These results indicated that that combined treatment increased the global availability of the active form of P-TEFb. After 24 hours of treatment ([Fig 8B](#)), we observed no P-TEFb release but a potentiated interaction between HEXIM1 and P-TEFb. This 24 hour effect contrasted with the 1 hour short-term effect and indicated reassembly of P-TEFb in the inactive 7SK snRNP complex. These results are consistent with the study of Liu *et al.* reporting that transient release of P-TEFb results in upregulation of its immediate target gene, HEXIM1, and reincorporation of P-TEFb into the 7SK snRNP [48]. Consistently, we also observed an increased expression of HEXIM1 after the 24 hours treatment compared to the 1 hour treatment ([Fig 8B](#), input panel), thereby favoring a negative feedback mechanism of P-TEFb activation.

In order to study the effect of the PKC agonist+BETi/HMBA combined treatments on P-TEFb activation in living cells, we took advantage of the first and very elegant experimental system allowing to monitor quantitatively *in vivo* the interaction between P-TEFb and its substrate, the C-terminal domain (CTD) of RNA polymerase II (RNAPII). This system named V-PAC (visualization of P-TEFb activation by fluorescent complementation) [49] is based on a bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay and uses complementary fragments of fluorescent proteins, the N-terminal region (termed VN) of Venus and the C-terminal region (termed YC) of YFP fluorescent protein. Because activated P-TEFb interacts with and phosphorylates the RNAPII CTD, we employed P-TEFb and the CTD as fusion partners of YC and VN, respectively as described in [49]. Our results demonstrated that the number of YFP-positive cells was higher following the combined bryostatin-1+JQ1 treatment than the numbers obtained after the individual drug treatments ([Fig 8C and 8D](#)). Altogether, these data strongly

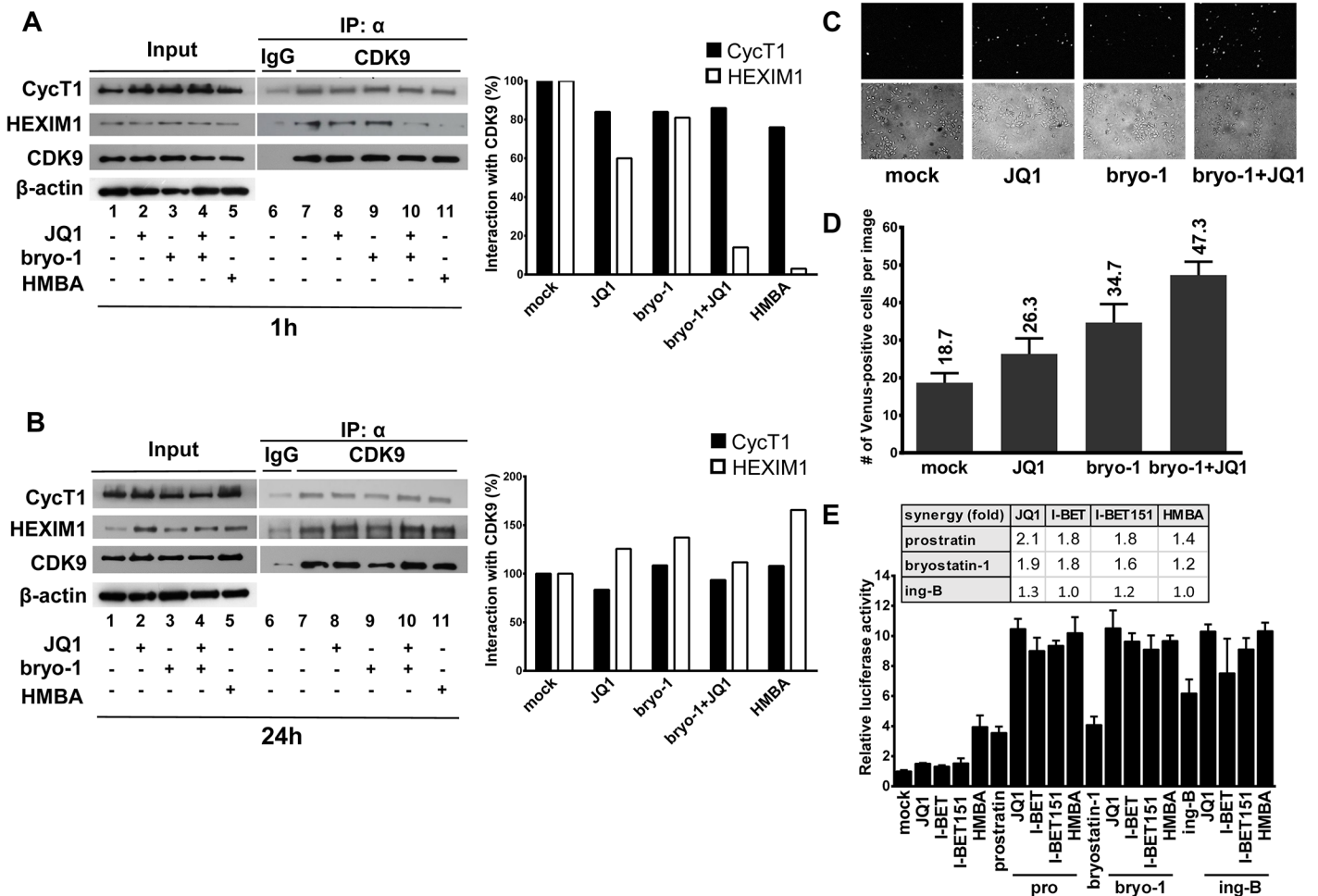


Fig 8. PKC agonists synergize with BETi in releasing active P-TEFb. Jurkat cells were mock-treated, treated with JQ1 (0.25µM), bryostatin-1 (5nM) alone or in combination for 1 hour (Panel A) or 24 hours (Panel B). Nuclear extracts were prepared from treated cells and subjected to immunoprecipitations (IP) with an anti-CDK9 antibody or the control IgG. The complexes were immunodetected for the presence of CycT1 and HEXIM-1 by Western blotting (right panels). Input controls for CDK9, CycT1 and HEXIM1 are presented (left panels). Levels of β-actin were measured to control protein loading. Panels A and B. Histograms represent quantification of band intensities normalized to CDK9 levels in the IP and then normalized to mock-treated condition. Panel C. HeLa cells expressing YC.P-TEFb and VN.CTD were left untreated or were treated as indicated for 1 hour. Venus-positive cells were detected by fluorescence microscopy (upper panels). Bright-field images were also taken (lower panels). Panel D. HeLa cells expressing YC.P-TEFb and VN.CTD were treated as outlined in C and Venus-positive cells were counted and averaged from three different areas. Error bars represent differences between counts of Venus-positive cells from the randomly chosen fields under the microscope. Panel E. HeLa cells were transfected with the Hex1(-104)Luc reporter plasmid. At 24 hours post-transfection, cells were mock-treated or treated with the different compounds as indicated. Luciferase activities in cell extracts were measured 24 hours after drug treatments and reported as fold increases over the activity observed in mock-treated condition (transfection of the reporter plasmid without drug treatment) and arbitrarily set at a value of 1. An experiment performed in duplicate representative of two independent experiments is shown.

doi:10.1371/journal.ppat.1005063.g008

indicated that combined LAR treatments led to higher activations of P-TEFb than the corresponding individual drug treatments.

To get further insights into the molecular mechanisms underlying the PKC agonist+BETi/HMBA synergistic gene expression activations induced by the combined treatments, we compared the effect of the drugs alone and in combination on P-TEFb-dependent transcription by reporter assays. More specifically, we transiently transfected HeLa cells with a reporter gene construct Hex1(-104)Luc containing the luciferase gene under the control of the HEXIM1 promoter which is responsive to active P-TEFb [48]. Transfected cells were mock-treated or treated with either PKC agonists (prostratin, bryostatin-1 and ing-B), either BETi (JQ1, I-BET

and I-BET151), or HMBA individually and in combination (Fig 8E). Our results demonstrated synergistic increases in luciferase activity following combined treatments. Of note, the PKC agonist+JQ1 combinations were more potent than the other combinations tested.

To further evaluate the signaling pathways leading to HIV-1 synergistic activation in response to PKC agonist+BETi cotreatments, we used chemical inhibitors targeting the NF- κ B, P-TEFb and NFAT pathways in both T-lymphoid and monocytic infected cells lines (Fig 9A and 9B, respectively). We showed that BAY 11-7082, an inhibitor of I κ B α phosphorylation, blocked an average of 50% and of 70% of the viral reactivation mediated by the combined treatment bryostatin-1+JQ1 in J-Lat 9.2 and THP89GFP cells, respectively. We used flavopiridol, a selective P-TEFb inhibitor, and we observed that this compound blocked an average of 50% and of 84% of viral activation mediated by the combined treatment bryostatin-1+JQ1 in J-Lat 9.2 and THP89GFP cells, respectively. In contrast, cyclosporin A, a potent NFAT inhibitor, had no effect on HIV-1 activation in both cell lines. These data confirmed that NF- κ B and P-TEFb, as opposed to NFAT, were involved in induction of HIV-1 in response to bryostatin-1+JQ1 cotreatment.

Mechanistically, using four independent assays (immunoprecipitations, biomolecular fluorescence complementation assays, reporter gene assays and experiments using various signaling pathways inhibitors), we demonstrated that PKC agonists (such as bryostatin-1) and BETi (such as JQ1) caused a more potent activation of P-TEFb when used in combination than when used alone. Taken together, these mechanistic data established a correlation between the potentiated P-TEFb activation and the potentiated or synergistic (depending on the HIV-1 latency cellular model used) induction of HIV-1 gene expression observed after the combined versus individual drug treatments. This potentiated release of P-TEFb from the inactive 7SK snRNP complex could explain the potentiated or synergistic activation of HIV-1 gene expression induced by PKC agonist+BETi/HMBA combined treatments.

PKC agonist+JQ1 co-treatments cause differential expression levels of cell surface activation markers and downregulate the expression of the CD4 receptor on CD4⁺ primary cells

Compounds that would be suitable for the therapeutic use *in vivo* should not lead to non-specific or robust immune activation. Additionally, drug-mediated decrease of CD4 receptor surface expression may be an important factor in the blockade of *de novo* HIV-1 infection. To determine whether individual and combined treatments of PKC agonists with JQ1 led to the cellular activation, we isolated CD8⁺-depleted PBMCs and resting CD4⁺ T cells from blood of 4 uninfected donors. The activation status of resting CD4⁺ T cells and of CD4⁺ cells analyzed from the mock-treated or treated CD8⁺-depleted PBMCs population was assessed by flow cytometry analysis of the cell surface activation markers CD69, CD25, HLA-DR and CD38. First, we assessed the activation status of resting CD4⁺ T cells. We observed that JQ1 treatment did not cause any upregulation of T cell activation markers (Fig 10A–10D). Bryostatin-1 and prostratin alone or combined with JQ1 induced the surface expression of CD69 in 10–40% of cells and the surface expression of HLA-DR in 10–20% of cells (Fig 10B and 10C, respectively). These treatments led to low changes in the expression of CD38 and CD25 (Fig 10A and 10D, respectively). Ing-B alone or combined with JQ1 induced CD69 surface expression in 10–15% of cells (Fig 10B). Interestingly, there was no ing-B-induced modulation of other activation markers (Fig 10A, 10C and 10D). In order to extend the data we obtained in resting CD4⁺ T cells, we examined the expression levels of activation markers on the surface of CD4⁺ cells analyzed from the mock-treated or treated CD8⁺-depleted PBMCs population. Similarly to what we demonstrated in resting CD4⁺ T cells, we observed that JQ1 individual treatment did not

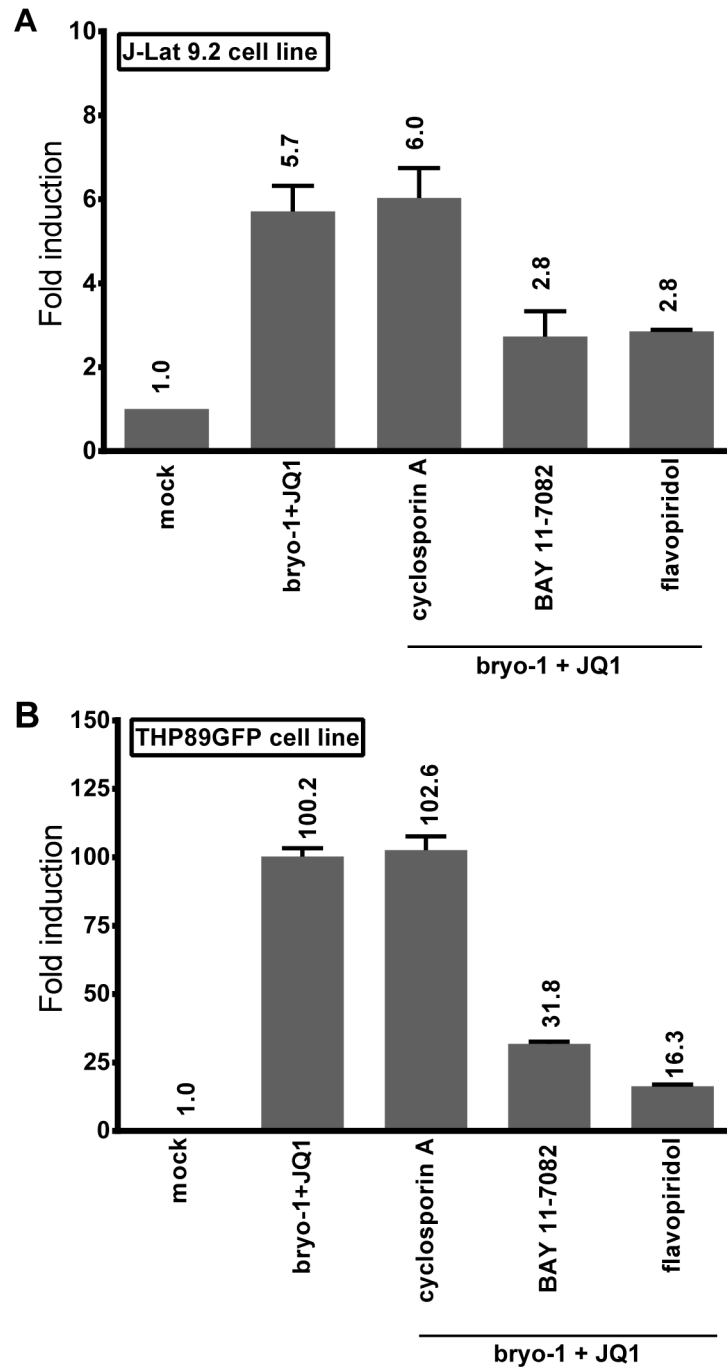


Fig 9. Bryostatin-1+JQ1-mediated HIV-1 reactivation is dependent on NF- κ B and P-TEFb and independent from NFAT. The T-lymphoid J-Lat 9.2 (panel A) and monocytic THP89GFP (panel B) cell lines harbor latent HIV-1 provirus containing *gfp* gene. The cells were pre-treated with the indicated inhibitors for 2 hours and then either mock-treated or treated with the combination bryostatin-1 [10nM]+JQ1 [0.5 μ M]. At 24 hours post-treatment, cells were analyzed by flow cytometry to quantify the proportion of cells expressing GFP. Means and standard errors of the means from duplicate samples are indicated. One representative experiment from two is represented.

doi:10.1371/journal.ppat.1005063.g009

cause any upregulation of activation markers (Fig 10F–10I). We showed that the individual and combined PKC agonists+JQ1 treatments led to differential increases in CD69, CD25,

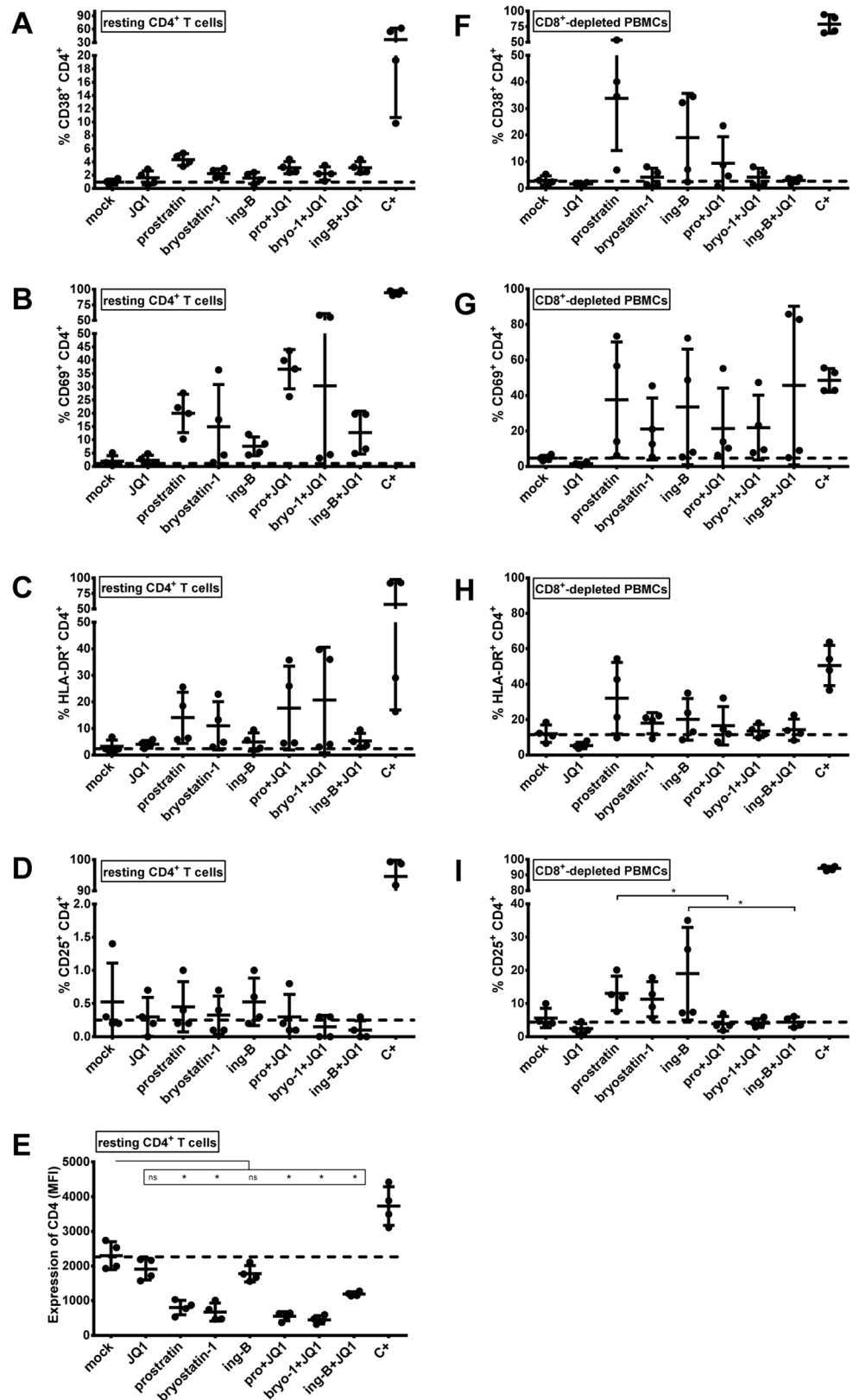


Fig 10. Expression of cell surface activation markers following PKC agonists and JQ1 treatments. Blood from 4 uninfected donors was split and one half was used to purify resting CD4⁺ T cells (panels A-E)

and the other half was used to purify CD8⁺-depleted PBMCs (panels F-I). Cell cultures were mock-treated, treated with anti-CD3+anti-CD28 antibodies (C+), JQ1 [0.25 μ M], bryostatin-1 [5nM], prostratin [0.5 μ M] or ing-B [10nM] alone or in combination for 6 days. Cells were incubated with anti-CD38 (panels A and F), anti-CD69 (panels B and G), anti-HLA-DR (panels C and H), anti-CD25 (panels D and I) or anti-CD4 (panel E) antibodies prior to flow cytometry analysis. The results are presented as percentage of marker expression in the population of CD4⁺ cells (panels A-D and panels F-I) and as median fluorescence intensity (MFI) of CD4⁺ cells (panel E). Dashed line indicates the percentage of expression obtained in mock-treated cells. The means are represented. Statistical comparisons are indicated. Statistically relevant and not statistically relevant comparisons are indicated by asterisk and "ns", respectively.

doi:10.1371/journal.ppat.1005063.g010

HLA-DR and CD38 surface expression levels. Interestingly, the combined treatments PKC agonists+JQ1 appeared to decrease PKC agonist-driven surface expression increases of CD38, HLA-DR and CD25 (Fig 10E, 10H and 10I, respectively). Since the CD38 marker is also constitutively expressed by naive CD4⁺ T cells, we analyzed the frequency of cells expressing simultaneously CD38 and HLA-DR (S7 Fig). Our data showed that the combined treatments PKC agonist+JQ1 appeared to decrease the PKC agonist-driven surface expression increases of these two activation markers. Next, we assessed the expression of CD4 surface receptor in resting CD4⁺ T cells following treatments with the drugs of interest (Fig 10E). PKC agonists were previously shown to exhibit anti-viral activity by decreasing surface expression of CD4 receptor which would lead to the blockade of *de novo* infection [16,22,25]. As shown in Fig 10E, we demonstrated that bryostatin-1, prostratin and ing-B strongly reduced the cell surface expression of CD4 receptor. Individual JQ1 treatment had a slight effect on the CD4 surface expression and combined treatments of PKC agonist+JQ1 appeared to slightly augment the PKC agonist-driven CD4 receptor downregulation.

In conclusion, we showed that JQ1 caused no activation of resting CD4⁺ T cells and CD4⁺ cells analyzed from the treated CD8⁺-depleted PBMCs population. Combined treatments including JQ1 and PKC agonists caused elevated surface expression levels of CD69 and HLA-DR and no or low upregulation of CD38 and CD25. Notably, the decrease in surface expression levels of activation markers we observed in CD4⁺ cells from PBMCs following combined treatments as compared to the PKC agonists individual treatments strengthened the potential of PKC agonist+JQ1 co-treatments for purging strategies because it indicated that the latter combinations decreased the levels of global T-cell activation induced by PKC agonists. Moreover, the combinations PKC agonist+JQ1 led to downregulation of CD4 receptor, which could be beneficial for the blockade of *de novo* infection.

Discussion

In this report, we performed an *in vitro* and *ex vivo* in-depth comparison of the reactivation potentials of two classes of latency-reversing agents, P-TEFb-releasing agents and PKC agonists. We demonstrated that combinations of LRAs from both classes led to strong synergistic activation of HIV-1 production in various post-integration latency cell line models of T-lymphoid and monocytic origins. Most importantly, we identified for the first time two potent combinations of LRAs, bryostatin-1+JQ1 and ing-B+JQ1, which activated latent HIV-1 to a degree comparable to that obtained with the positive control anti-CD3+anti-CD28 antibodies in a high number of *ex vivo* patient cell cultures and at multiple time points. Mechanistically, we provide a molecular explanation for these synergistic or potentiated viral reactivations by demonstrating a stronger activation of both P-TEFb and NF- κ B activities following combined versus individual LRA treatments. We showed by bimolecular fluorescence complementation assays that the potent LRA effects observed resulted from a higher activation of P-TEFb. JQ1 alone failed to potentially reactivate HIV-1 from latently-infected T cells. This could be explained

by the fact that the level of P-TEFb is very low in resting T cells due to actions of specific miRNAs and the cellular factor NF-90 which block translation of CycT1 mRNA [50–53]. However, we demonstrated that JQ1 was a good candidate for combinatory treatments with compounds that increase the amount of P-TEFb.

The combined effects of PKC agonists and BET inhibitors are the result of the induction of P-TEFb production by PKC agonists [27,38,39] and of the release of P-TEFb from the repressive 7SK snRNP complex by BETi/HMBA [31,37]. In addition, Peterlin's group has previously shown that PKC agonists also phosphorylate HEXIM1 at a specific serine residue, leading to release of active P-TEFb from the 7SK snRNP complex and induction of P-TEFb-dependent transcription [40]. In the present study, we confirmed this additional effect of bryostatin-1 and we demonstrated that the combination bryostatin-1+JQ1 caused a higher release of PTEF-b from its inactive 7SK snRNP complex than the drugs alone. We demonstrated a higher activation of P-TEFb following combined treatments of PKC agonist+BETi/HMBA by V-PAC assays. This higher P-TEFb activation can be explained by the dual effect of PKC agonists on P-TEFb (the CycT1 and CDK9 syntheses and the P-TEFb release from the 7SK snRNP complex) and by the additional effect of BETi/HMBA on the release of P-TEFb.

Moreover, McNamara and colleagues showed that, during activation of the inflammatory transcriptional program, the inducible recruitment of P-TEFb by NF- κ B through PPM1G to promoters of inflammatory-responsive genes disassembles the 7SK snRNP and releases P-TEFb for transcription elongation [54]. Such an interaction could occur at the HIV-1 promoter, thereby providing an additional explanation for the synergistic activation of HIV-1 gene expression in response to PKC agonist+P-TEFb-releasing agent combined treatments.

Interestingly, our transient transfection experiments showed that combined treatments induced HIV-1 promoter-driven luciferase activity and that maximal synergistic activations required intact NF- κ B binding sites in the enhancer region of the HIV-1 LTR. We showed that JQ1 synergistically increased bryostatin-1-induced NF- κ B DNA-binding activity by EMSAs. This observation indicated that JQ1 played a role in controlling NF- κ B activity either by targeting P-TEFb or by still unidentified mechanism(s). Therefore, this increase of NF- κ B binding activity following the bryostatin-1+JQ1 treatment could be explained by the stabilization of the NF- κ B/PPM1G/P-TEFb complex at the viral promoter. Recently, Zou and colleagues have shown that the BRD4 protein interacts with acetylated NF- κ B and that this interaction maintains NF- κ B constitutively active [55]. These authors have also demonstrated that JQ1 treatment disrupts this BRD4-acetylated NF- κ B protein complex, leading to a decreased NF- κ B transcriptional activity [42]. In contrast, the present study demonstrated that combined treatments PKC agonists+JQ1 exhibited beneficial effects on NF- κ B activity (Fig 7A) and DNA-binding (Fig 7B). Additional studies will be necessary to further elucidate the role of JQ1 in NF- κ B regulation.

Of note, the molecular mechanisms mediating the PKC agonists+BETi/HMBA synergy are likely to be highly complex and to implicate phenomena other than the P-TEFb and NF- κ B regulations. For example, the following elements could also intervene in the molecular mechanisms of synergistic activation after combined PKC agonist+BETi/HMBA treatment: (i) NF- κ B interactions with histone acetyltransferase, including p300 and CREB-binding protein (CBP) [56], (ii) direct interaction of P-TEFb with the cellular cofactor CTIP2 (COUP-TF-interacting protein 2) previously reported by our laboratory as involved in HIV-1 silencing in microglial cells [57] as well as (iii) the involvement of HMGA-1 (non-histone chromatin protein high mobility group AT-hook 1) in this P-TEFb/CTIP2 regulation [58].

Remarkably, Weinberger's group has recently observed that conventional transcriptional activators synergize with "noise" modulators that affect gene expression fluctuations without changing mean expression [59]. Our data constitutes a good example of such a regulation since

we observed a synergy between PKC agonists which represent conventional transcriptional activators and P-TEFb-targeting compounds that act at the level of transcriptional elongation (noise-enhancing compounds). Indeed, PKC agonists activate the LTR by increasing transcriptional initiation, thereby increasing “burst frequency”. This effect on transcriptional initiation is potentiated by the effect of compounds releasing P-TEFb (BETi/HMBA and PKC agonists themselves) that augment elongation duration, thereby increasing the transcriptional “burst size”.

Viral reactivation trials using LRA have been carried out and failed to demonstrate a reduction of the reservoirs size [60,61]. The important multicentric study conducted by Vincente Planelles and colleagues has shown that LRA often fail to reactivate HIV uniformly across different latency models [44]. The activity of a given LRA, demonstrated in a particular cellular model, cannot reliably predict its activity in other HIV-1 latency model systems. Therefore, it is essential to accumulate evidence for the reactivation potential of a single compound or combinations of compounds in several *in vitro* as well as *ex vivo* patient cell cultures in order to identify and validate potential promising reactivating treatments. In the present study, we first demonstrated the ability of co-treatments of PKC agonist+compound releasing active P-TEFb to activate expression of latent HIV *in vitro* not only in an HIV-1 T-lymphoid post-integration latency cell line model but also in promyelocytic, promonocytic, monocytic, and microglial latency cell lines. Indeed, several previous studies have reported that latency can also be established in cells of the monocyte/macrophage lineage including microglial cells, the brain resident macrophages and it is probably impossible to achieve an HIV cure without also considering these latent reservoirs (reviewed in [62]). We next confirmed the physiological relevance of the PKC agonist+BETi/HMBA co-treatments in *ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs or of resting CD4⁺ T cells isolated from cART-treated HIV-1⁺ aviremic patients. Spina *et al.*[44] have compared a panel of known stimuli *in vitro* in multiple cell model systems and *ex vivo* in resting CD4⁺ T cells from aviremic patients and they have reported that PKC agonists and PHA reactivate latent HIV uniformly across the different models, although drugs of other classes do not. Recently, Siliciano and colleagues have demonstrated that among a panel of LRA, only bryostatin-1 effectively reversed HIV-1 latency. Importantly, the ability of bryostatin-1 to induce HIV-1 recovery was much lower than the effect obtained with the positive control in the three independent *ex vivo* assays used by these authors [63]. Here, we demonstrated that P-TEFb releasing compounds, especially JQ1, potentiated the effect of PKC agonists. Remarkably, the mean extracellular HIV-1 RNA level obtained with the bryostatin-1 +JQ1 combination was similar to the mean level obtained with the positive control. Moreover, the percentage of reactivated cultures following treatment with this combination was identical to the percentage we observed with the positive control (79%). We confirmed in resting CD4⁺ T cells isolated from 15 cART-treated HIV⁺ patients the results obtained in the *ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs. Indeed, we observed that the combinations of JQ1 with bryostatin-1 or with another promising PKC agonist, ing-B, activated latent HIV-1 to a mean extracellular HIV-1 RNA level similar to that obtained with the anti-CD3+anti-CD28 antibodies positive control stimulation. This result constitutes the first demonstration of anti-latency combinations exhibiting such a potent effect. Importantly, we confirmed in the presence of cART the HIV reactivation potentials of the two most promising combinations *ex vivo* and furthermore demonstrated that their potent effects were already detected 24 hours post-treatment. Indeed, not only at 24 hours but also at 72 hours post-stimulation, the percentage of reactivated cultures following treatment with the two combinations was higher than the percentage we observed with the positive control. Surprisingly, the effect of the bryostatin-1+JQ1 cotreatment was statistically superior to that observed after a 24 hours global T cell activation. This latter

observation would be of interest in the perspective of a clinical trial since bryostatin-1 is generally administrated as continuous infusion of 24 hours [46] or 72 hours [47].

It should be noted that we did not observe viral reactivation either after individual, combined or anti-CD3+anti-CD28 treatments in all patient cell cultures, thereby supporting the notion that establishment of viral latency is a multifactorial and stochastic phenomenon. Siliciano's group has recently demonstrated in an elegant study that only some replication-competent viruses could be activated after single round of maximum *in vitro* stimulation [64]. Therefore, multiple rounds of stimulation might be necessary in order to reach efficient HIV-1 reactivation. Moreover, as reported by us previously [65,66], we observed here again high diversity among the patient cell cultures in terms of pattern of response to the different LRAs tested. This phenomenon reflects the heterogeneity of the reservoirs and the multiplicity of the mechanisms which underlie latency and probably vary from one patient to the other and even from one cell to the other in single patient. This observation highlights the necessity to test a great number of patient blood samples in *ex vivo* experiments in order to identify promising LRA. It also emphasizes the need to evaluate the efficacy of an LRA first *ex vivo* in cell cultures from a given patient before the administration of this LRA to this given patient *in vivo* in the context of a clinical trial.

Among the characteristics necessary for clinically testable LRAs, toxicity is a crucial concern. The major problem with PKC activators is the nonspecific induction of many genes following activation of PKC-related pathways and the toxicity caused by the systematic release of cytokines. Indeed, an ideal LRA for a shock and kill strategy should reverse HIV from latency without causing a broad and robust T-cell activation [15]. Nevertheless, low level and short-term T-cell activation will likely be required for efficient HIV-1 reactivation since viral transcription is directly affected by events related to cellular activation including translocation of the NF- κ B transcription factor. Combinations of either bryostatin-1 or ing-B with JQ1 and the synergistic effects obtained here *in vitro* and *ex vivo* with these molecules allowed us to use very low drug concentrations and could therefore cause *in vivo* lower toxic effects, notably due to global T-cell activation. Importantly, our data strengthened the advantage of combined treatments not only because of reduced drug concentrations but also because the PKC agonist+JQ1 combined treatments appeared to further decrease the PKC agonist-driven elevated surface expression levels of activation markers. PKC agonists have been previously reported to exhibit anti-viral activity by decreasing surface expression of CD4 receptor that could favor the blockade of *de novo* infection [67]. Interestingly, in the present study, we observed that combinations of PKC agonists with JQ1 tended to even augment the PKC agonist-driven downregulation of CD4 receptor.

Finally, our in-depth comparison of PKC agonist+compound releasing P-TEFb co-treatments allowed us to identify the bryostatin-1+JQ1 and ing-B+JQ1 combinations as presenting a potent ability to induce expression of latent HIV. Bryostatin-1 is of particular interest because it has been tested in more than 20 clinical trials for cancer and Alzheimer's disease. Importantly, a phase I clinical trial with bryostatin-1 has been performed in children with solid tumors and peak concentrations of bryostatin-1 ($10\text{--}20\times 10^{-9}$ M) reached in several patients were higher than the concentration we used in our *ex vivo* experiments (5nM) [68]. The bryostatin-1 infusion has been well tolerated in this phase I clinical trial since only few patients have experienced myalgia, photophobia or eye pain [53]. Moreover, ing-B has been evaluated *in vivo* in rats, dogs, and Rhesus macaques by oral dosing and presents low toxic profiles (Aurigon Life Science, and L. Gama, oral communication). Of note, another ingenol ester, called ingenol-3-angelate, is used for treatment of actinic keratosis [69]. However, ingenol-3-angelate is only used as a topical cutaneous treatment and is practically not absorbed through the skin (<http://www.drugs.com/pro/picato.html>). Importantly, ingenol-3-angelate appears to be more toxic

than ing-B when orally delivered to rats and dogs (Luiz Pianowski, Kyolab, Brazil, personal communication). Regarding the BETi, JQ1 presents very promising anti-cancer effects in pre-clinical trials [70,71] as well as anti-inflammatory effects [72]. Clinical trials with JQ1-derivative called TEN-010 (also called JQ2) and another BETi called GSK525762 have been initiated recently to characterize their safety, tolerability, pharmacokinetics and anti-cancer activity (clinicaltrials.gov).

Nevertheless, we are aware that the fate of pharmacologically reactivated HIV⁺ cells is not fully understood. Even a potent activation of HIV-1 expression might not be sufficient enough to kill the reactivated cells and to decrease the size of the latent reservoirs. Additional interventions would be needed to eliminate cells expressing viral proteins such as immunostimulatory strategies to enhance antiviral immune effector functions [for example by boosting cytotoxic T lymphocytes (CTL) responses] [73]. In conclusion, we reported a proof-of-concept for the co-administration of two different types of LRAs (a PKC agonist and a compound releasing P-TEFb) as a therapeutic perspective to decrease the size of the HIV-1 reservoirs in presence of efficient cART. This study not only identifies new promising LRAs combinations but also highlights the patient-specific variations in the responses to these HIV-1 inducers, likely reflecting heterogeneity in the molecular mechanisms regulating HIV-1 latency. The understanding of the factors involved in this patient-to-patient diversity represents a key challenge in the race for a cure or a durable remission of HIV infection.

Of note, during the preparation of our manuscript, Siliciano group has reported that protein kinase C agonists in combination with JQ1 or HDACi robustly induce HIV-1 transcription and production in cell cultures from blood of cART-treated HIV⁺ patients [74].

Materials and Methods

Cell lines and cell culture

The CD4⁺ T-lymphoid cell lines Jurkat, J-Lat 9.2, J-Lat A2 (harboring an LTR-Tat-IRES-GFP construct), J-Lat A72 (harboring LTR-GFP construct) and myeloid lineage cell lines U1 and OM10.1 were obtained from the AIDS Research and Reference Reagent Program (National Institute of Allergy and Infectious Diseases [NIAID], National Institute of Health [NIH]). The monocytic THP89GFP cell line [42] is a kind gift from David N. Levy (New York University College of Dentistry, New York, USA). These cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco-BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 U/ml of penicillin, 50 mg/ml of streptomycin at 37°C in a humidified 95% air/5% CO₂ atmosphere. The microglial cell line CHME-5/HIV [41] is a kind gift from Jonathan Karn (Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA). This cell line was cultured in Dulbecco's modified Eagle's-Glutamax I medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 50 U/ml of penicillin, 50 mg/ml of streptomycin at 37°C in humidified 95% air/5% CO₂ atmosphere.

Reagents

TNF α (300-01A) was purchased from Immunosource. Prostratin (12 deoxyphorbol-13-acetate) (PE 187-0001) were provided by Enzo Life Sciences. Bryostatin-1 (B7431) was purchased from Sigma. Ing-B was kindly donated by Luiz F. Pianowski, Kyolab/Amazônia Fitomedicamentos, Valinhos, Sao Paulo, Brazil. JQ1 (2091-1) and I-BET151 (2220-1) were purchased from BioVision. I-BET (401010) was purchased from Calbiochem. HMBA (H4663) was purchased from Sigma. Human CD3 (IMI1304) and CD28 (IMI1376) antibodies were obtained from Analis. BAY 11-7082 (B5556), Flavopiridol (F3055) and cyclosporin A (C2163000) were purchased from Sigma. Efavirenz (4624), Zidovudine (3485) and Raltegravir (11680) were

obtained from the AIDS Research and Reference Reagent Program (National Institute of Allergy and Infectious Diseases [NIAID], National Institute of Health [NIH]).

All compounds, resuspended and stored as recommended by the manufacturer, were diluted immediately before use in cell culture medium.

Cellular metabolic activity and viability assays

Cellular metabolic activity was evaluated by the colorimetric test WST-1 (Roche). Cell viability was assessed by trypan blue exclusion assay.

Virus production assays

HIV-1 production was measured in the supernatant of the J-Lat 9.2, U1 and OM10.1 cell cultures by determining CA-p24 antigen ELISA (FUJIREBIO).

Flow cytometry

J-Lat 9.2, J-Lat A2, J-Lat A72, THP89GFP and CHME-5/HIV cell lines were mock-treated or treated for 24 hours with the different compounds alone or in combination. Cells were washed twice in PBS, resuspended in PBS containing 4% paraformaldehyde and fixed for 1 hour in the dark. Cells were next washed twice in PBS and resuspended in FACS buffer (PBS, BSA 0.1%, NaN₃ 0.1%). The percentage of GFP-positive cells was measured on a CXP cytometer (Cytomics FC 500, Beckman Coulter) using CXP Software version 1.0 according to the manufacturer's instructions.

RNA extractions and analyses of initiated and elongated HIV-1 transcripts

Total RNA samples were isolated using the RNeasy Plus kit (Qiagen) from 1×10^6 cells and digested with TURBO DNase (TURBO DNA-free™ kit, Ambion). First strand cDNA was synthesized using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Quantitative real-time PCR reactions were performed using the PerFecTa SYBR Green Super Mix, ROX (Quanta). Initiated transcripts were detected with primers TAR (FW, 5'-GTTAGACCAGATCTGAGCCT-3' and RV, 5'-GTGGTTCCCTAGTTAGCCA-3'). Elongated transcripts were detected with two different sets of primers: *tat* (FW, 5'-ACTCGACAGAGGAGAGCAAG-3' and RV 5'-GAGATCTGACTGTTCTGATGA-3') and *env* (FW, 5'-GACATTTGTACATGGTCCTGTTC-3' and RV, 5'-GGCTGGTTTTGCGATTCTAA-3'). cDNA were quantified and normalized to the β -Actin mRNA level as previously described [65].

Transient transfection and luciferase reporter assays

Jurkat cells were transfected with the pLTR-luc and the pLTR-NF κ Bmut-luc luciferase reporter episomal vectors using JetPEI™ (POLYplus) method according to the manufacturer's protocol. Twenty-four hours post-transfection, cells were mock-treated or treated with the different compounds as indicated. At 24 hours post-treatment, cells were lysed and assayed for luciferase activity (Promega) as previously described [66]. Luciferase activities were normalized with respect to protein concentrations.

HeLa cells were transiently transfected with the Hex1(-104)Luc reporter plasmid [48] by X-tremeGENE HP Transfection Reagents (Roche). At 24 hours post-transfection, cells were mock-treated or treated with the different compounds as indicated. At 24 hours post-treatment, cells were lysed and assayed for luciferase activity (Promega). Luciferase activities were normalized with respect to protein concentrations.

V-PAC assay

V-PAC assays were performed as described previously with a minor modification by using more potent Venus fluorescent proteins instead of original Yellow Fluorescent proteins [49]. Briefly, 1 million of HeLa cells were transfected with 0.4 μ g of plasmid DNA encoding YC-P-TEFb and 1.2 μ g of plasmid DNA encoding VN-CTD using X-tremeGENE Transfection Reagents (Roche). Twenty-four hours post-transfection, the cells were split into 24-well plates and kept in 5% FCS. At 48 hours post-transfection, the cells were mock-treated or treated with the different compounds as indicated for 60 min. Fluorescence signals were detected by microscopic analysis using Olympus IX70 bright field fluorescent microscope. The fluorescence images were analyzed using Metamorph software and Venus positive cells were manually counted and averaged from three randomly chosen fields of each sample.

EMSAs

Jurkat cells were mock-treated or treated with various compounds as indicated and 24 hours post-treatment cells were subjected to nuclear extract preparation using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific). EMSAs with the HIV-1 NF- κ B probe were performed as previously described [65]. As loading controls, the same nuclear extracts were tested for binding of Oct-1 (octamer-binding protein-1) to an Oct-1 consensus probe as previously described [65].

Coimmunoprecipitation assays and western blot analyses

Immunoprecipitations with anti-CDK9 (sc13130, Santa Cruz) antibody and control IgG (Millipore) were performed with 100 μ g of nuclear extracts from Jurkat cells. The immunoprecipitated proteins were processed for SDS/PAGE and Western blot analysis. The P-TEFb complexes were detected using antibodies directed against CycT1 (sc8127), CDK9 and HEXIM1 (sc48872) (Santa Cruz). Western blotting of the inputs were performed with 20 μ g of the nuclear extracts. The β -actin (A5441, Sigma) was immunodetected as loading control. Quantifications of the CDK9-associated HEXIM1 and CycT1 were performed with the ImageJ software (National Institutes of Health, NIH).

Study subjects

We selected 50 HIV-1-infected individuals at the St-Pierre Hospital (Brussels, Belgium) on the basis of the following criteria: all volunteers were treated with cART for at least 1 year, had an undetectable plasma HIV-1 RNA level (20 copies/ml) for at least 1 year and had a level of CD4⁺ T lymphocytes higher than 300 cells/mm³ of blood. Characteristics (age, CD4⁺ T cell count, CD4⁺ nadir, antiviral regimens, duration of therapy, duration with undetectable plasma HIV-1 RNA level, and HIV-1 subtypes) of patients from the St- Pierre Hospital were well documented and are presented in the [S1 Table](#).

Ethics statement

Ethical approval was granted by the Human Subject Ethics Committees of the Saint-Pierre Hospital (Brussels, Belgium). All individuals enrolled in the study provided written informed consent for donating blood.

Isolation of CD8⁺-depleted PBMCs and resting CD4⁺ T cells

CD8⁺-depleted PBMCs used in reactivation assays were isolated from fresh whole blood of HIV⁺ patients as previously described [65] [66]. Resting CD4⁺ T cells were isolated from

PBMCs of HIV⁺ patients using a negative selection on a Robosep (Stemcell) using cocktail of antibodies (Custom kit, Stem Cells). For each treatment, six million CD8⁺-depleted PBMCs or 0.5 million of resting T cells (CD8⁻, CD14⁻, CD16⁻, CD19⁻, CD20⁻, CD36⁻, CD56⁻, CD66b⁻, CD123⁻, TRCγ/δ⁻, glycoprotein A⁻, HLA-DR⁻, CD69⁻, CD25⁻) were seeded in LGM-3 Growth Medium (Lonza). One day after isolation, cells were mock-treated or treated with anti-CD3/CD28 antibodies as a positive control or by various LRAs for 6 days. Medium was harvested at day 1, day 3 and day 6, replaced with fresh medium containing compounds when appropriate at day 1 and day 3 and used for quantification of HIV-1 RNA. For the time course experiment, 12 million of PBMCs were seeded in the presence of antiretrovirals [Efavirenz (100nM), Zidovudine (180nM), Raltegravir (200nM)].

Quantification of total HIV-1 DNA

The total cellular DNA was extracted from patient CD8⁺-depleted PBMCs or resting CD4⁺ T cell *ex vivo* cultures using the QIA amp DNA Mini or the QIA amp Micro kit (Qiagen), respectively. The total cell-associated HIV-1 DNA was then quantified by ultra-sensitive real-time PCR (Generic HIV DNA cell kit, Biocentric [75]) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative assessment of HIV-1 RNA from culture supernatants of patient cells

Six days after drug treatment, culture supernatants from either patient CD8⁺-depleted PBMCs or patient resting CD4⁺ T cell *ex vivo* cultures were collected for RNA extraction using QIA amp Viral RNA Mini kit (Qiagen). HIV-1 RNA levels were quantified using the Generic HIV Charge Virale kit (Biocentric) according to the manufacturer's instructions (detection limits of 150 HIV-1 RNA copies/ml or 15 HIV-1 RNA copies/ml depending on tested supernatant volumes).

Infection assays in Jurkat cell line with *ex vivo* reactivated viruses

The outgrowth viruses, previously quantified by the determination of extracellular HIV-1 RNA concentration, were concentrated by ultracentrifugation of 3ml of culture supernatants collected 6 days post-treatment and resuspended in 50μl of culture medium. Infections of Jurkat cells were performed by resuspending 50 thousand cells in 50μl of the outgrowth viral stocks and incubating at 37°C for 2 hours. The multiplicity of infection was in the range of 0.02–0.05. After infection, the cells were pelleted at 300xg, washed three times with 200μl of culture medium, resuspended in 200μl of culture medium, and grown under standard conditions in 96-well plates. Two days post-infection, cells were amplified by adding 400μl of culture medium and seeded in 24-well plates. Six days post-infection, 350μl of culture supernatants were collected for RNA extraction using QIAamp Viral Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. HIV-1 RNA levels were quantified using the Generic HIV Charge Virale kit (Biocentric) (detection limit of 75 HIV-1 RNA copies/ml).

Cell activation analysis by flow cytometry

For cell activation analysis, CD8⁺-depleted PBMCs or resting CD4⁺ T cells isolated from blood of uninfected donors were used to establish *ex vivo* culture cells. Cells were collected 6 days after stimulation with different LRAs and were stained with relevant antibodies. All antibodies were purchased from BD Biosciences and included three antibody cocktails. The first cocktail included anti-CD4 (557852), anti-CD8 (345774) and anti-CD38 (345806). The second cocktail included anti-CD4 (345770), anti-CD8 (348813), anti-HLA-DR (347401), anti-CD69 (347823)

and anti-CD25 (340907). The third cocktail included anti-CD4 (345770), anti-CD8 (345772), anti-CD38 (555462) and anti-HLA-DR (347401). Marker staining was assessed by flow cytometry analysis on a FACS CantoII (Becton-Dickinson) and analyzed using the FACSDiva Software (Becton-Dickinson).

Statistical analysis

T-cell activation data, *ex vivo* reactivation studies using patient cell cultures of CD8⁺-depleted PBMCs or of resting CD4⁺ T cells are shown as means. Data sets were analyzed using an unpaired, nonparametric Mann-Whitney U test. $P < 0.05$ was considered statistically relevant. Analyses were performed using Prism version 6.0 (GraphPad software).

Supporting Information

S1 Fig. PKC agonists and compounds releasing active P-TEFb increase HIV-1 production in a dose-dependent manner with marginal effects on cell viability. The J-Lat 9.2 (panels A, C, E, and G) and U1 (panels B, D, F, and H) cell lines were mock-treated or treated with increasing doses of compounds as indicated. At 24 hours post-treatment, CA-p24 production in cell supernatants (panels A, B, E, and F) or cell metabolic activity (panel C, D, G, and H) were measured. Results obtained with the mock-treated cells were arbitrary set at a value of 1 or 100%, respectively. Means and standard errors of the means from duplicate samples are indicated. One representative experiment from three is represented. (PPT)

S2 Fig. PKC agonists and compounds releasing active P-TEFb increase HIV-1 production in OM10.1 cell lines. OM10.1 cells were mock-treated or treated with JQ1 (0.5 μ M), I-BET (0.5 μ M), I-BET151 (0.5 μ M), HMBA (5mM), bryostatin-1 (10nM) and prostratin (2.5 μ M) alone or in combination as indicated. At 24 hours post-treatment, CA-p24 production in cell supernatants were measured. Results obtained with the mock-treated cells were arbitrary set at a value of 1 or 100%, respectively. Means and standard errors of the means from duplicate samples are indicated. One representative experiment from two is represented. For each combinatory treatment, the fold-synergy was calculated by dividing the effect observed after co-treatments by the sum of the effects after the individual treatments. (PPT)

S3 Fig. PKC agonist+BETi/HMBA combined treatments increase HIV-1 expression in a higher proportion of cells than the drug alone. The THP89GFP cells (panel A), J-Lat cell line A2 (containing stably integrated LTR-Tat-IRES-GFP construct, panel B) or A72 (panel C) containing a stably integrated LTR-GFP construct were mock-treated, treated with JQ1 (0.5 μ M), I-BET (0.5 μ M), I-BET151 (0.5 μ M), HMBA (5mM), bryostatin-1 (10nM) and prostratin (2.5 μ M) alone or in combination as indicated. At 24 hours post-treatment, cells were analyzed by flow cytometry to quantify the proportion of cells expressing GFP. Means and standard errors of the means from duplicate samples are indicated. One representative experiment from two is represented. For each combinatory treatment, the fold-synergy was calculated by dividing the effect observed after co-treatments by the sum of the effects after the individual treatments. (PPT)

S4 Fig. PKC agonist+BETi/HMBA combined treatments increase the expression of GFP. The J-Lat 9.2 cell line (panel A), CHME-5/HIV microglial cells (panel B) or THP89GFP monocytic cells (panel C) harbor latent HIV1 provirus containing *gfp* gene. The cells were mock-treated, treated with JQ1 (0.5 μ M), I-BET (0.5 μ M), I-BET151 (0.5 μ M), HMBA (5mM),

bryostatin-1 (10nM) and prostratin (2.5 μ M) alone or in combination as indicated. At 24 hours post-treatment, cells were analyzed by flow cytometry and the mean fluorescence intensity (MFI) was analyzed to quantify the amount of GFP produced. Means and standard errors of the means from duplicate samples are indicated. One representative experiment from three is represented. For each combinatory treatment, the fold-synergy was calculated by dividing the effect observed after co-treatments by the sum of the effects after the individual treatments. (PPT)

S5 Fig. Effects of BETi, HMBA and PKC agonists on cell viability in CD8⁺-depleted PBMCs. WST-1 assay on *ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs isolated from blood of 5 uninfected donors were incubated with indicated compounds for 6 days. The result obtained with mock-treated cells was set at a value of 100%. (PPT)

S6 Fig. Effects of PKC agonists and JQ1 individual and combined treatments on cell viability in CD8⁺-depleted PBMCs. Panel A. WST-1 assay on *ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs isolated from blood of 4 uninfected donors were incubated with indicated compounds for 6 days. The result obtained with mock-treated cells was set at a value of 100%. Panel B. Cell viability. Trypan blue exclusion assay was performed on the same patient cell cultures as described in (A). The result obtained with mock-treated cells was set at a value of 100%. (PPT)

S7 Fig. Expression of the CD38 and the HLA-DR cell surface activation markers following PKC agonists and JQ1 treatments. CD8⁺-depleted PBMCs from 4 uninfected donors were mock-treated, treated with anti-CD3+anti-CD28 antibodies (C+), JQ1 (0.25 μ M), bryostatin-1 (5nM), prostratin (0.5 μ M) or ingenol B (10nM) alone or in combination for 6 days. Cells were incubated with anti-CD38, anti-HLA-DR, anti-CD4 and anti-CD8 antibodies prior to flow cytometry analysis. The results are presented as percentage of marker expression in the population of CD4⁺ cells. Dashed line indicates the percentage of expression obtained in mock-treated cells. The means are represented. (PPT)

S1 Table. Presentation of patient characteristics. Characteristics (age, CD4⁺T cell count, CD4⁺ nadir, antiviral regimens, duration of therapy, duration with undetectable plasma HIV-1 RNA level, and HIV-1 subtypes) of patients from the St- Pierre Hospital are presented. "X" indicates not reported. (PPT)

S2 Table. Infections of Jurkat cells with viruses isolated from bryostatin-1+JQ1-treated *ex vivo* patient cell cultures. *Ex vivo* cultures of CD8⁺-depleted PBMCs from blood of 3 cART-treated HIV⁺ patient were treated with bryostatin-1+JQ1 for 6 days. Concentrations of viral RNA in culture supernatants were measured and were expressed as HIV-1 RNA copies/ml. Total HIV-1 DNA was expressed as HIV-1 DNA copies/10⁶ CD8⁺-depleted PBMCs. Viruses collected from *ex vivo* cell cultures were used to perform *de novo* infection of Jurkat cells. Six days post-infection, Jurkat culture supernatants were collected and concentrations of viral RNA in culture supernatants were quantified and expressed as HIV-1 RNA copies/ml). (PPT)

Acknowledgments

We thank the HIV-1⁺ patients for their willingness to participate in this study. We thank the nursing team of CHU Saint-Pierre hospital (Elodie Goudeseune, Joëlle Cailleau and Annick Caestecker) who cared for the patients. We thank Jacqueline Pineau from the transfusion center of Charleroi (Belgium) for providing blood from uninfected donors. We thank Christelle Cardona from Carine Van Lint's lab, Ludivine David from Christine Rouzioux's laboratory and Hilde Vereertbrugghen from Francis Corazza's laboratory for excellent technical assistance. The T-lymphoid cell lines (Jurkat, J-Lat 9.2, J-Lat A2 and J-Lat A72) and the promonocytic cell line U1 were obtained from the AIDS Research and Reference Reagent Program (National Institute of Allergy and Infectious Disease [NIAID], National Institute of Health [NIH]). We thank Jonathan Karn for providing the microglial cell line CHME-5/HIV. We thank David N. Levy for providing the monocytic THP89GFP cell line. We thank Dolores Vaira from ULg and Sylvain Fauquenoy from Carine Van Lint lab for their precious advice.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CVL OR. Performed the experiments: GD AK SB KF AAA ND AM CV BVD JSG TC. Analyzed the data: GD AK SB KF FC CR OR CVL CS AB MM BMP. Contributed reagents/materials/analysis tools: LFP LG JV. Wrote the paper: GD AK CVL. Performed patient selection: KK NC SDW.

References

1. Smit C, Geskus R, Walker S, Sabin C, Coutinho R, et al. (2006) Effective therapy has altered the spectrum of cause-specific mortality following HIV seroconversion. *AIDS* 20: 741–749. PMID: [16514305](#)
2. Friis-Moller N, Sabin CA, Weber R, d'Arminio Monforte A, El-Sadr WM, et al. (2003) Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 349: 1993–2003. PMID: [14627784](#)
3. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF (2002) The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* 53: 557–593. PMID: [11818490](#)
4. Crowe S, Zhu T, Muller WA (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. PMID: [12960232](#)
5. Lewin SR, Kirihaara J, Sonza S, Irving L, Mills J, et al. (1998) HIV-1 DNA and mRNA concentrations are similar in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages in HIV-1-infected individuals. *AIDS* 12: 719–727. PMID: [9619803](#)
6. Bergamaschi A, Pancino G (2010) Host hindrance to HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Retrovirology* 7: 31. doi: [10.1186/1742-4690-7-31](#) PMID: [20374633](#)
7. Crowe SM, Sonza S (2000) HIV-1 can be recovered from a variety of cells including peripheral blood monocytes of patients receiving highly active antiretroviral therapy: a further obstacle to eradication. *J Leukoc Biol* 68: 345–350. PMID: [10985250](#)
8. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, et al. (2009) HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*.
9. Maldarelli F, Wu X, Su L, Simonetti FR, Shao W, et al. (2014) HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* 345: 179–183. doi: [10.1126/science.1254194](#) PMID: [24968937](#)
10. Chun TW, Davey RT Jr., Ostrowski M, Shawn Justement J, Engel D, et al. (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. PMID: [10888923](#)
11. Saez-Cirion A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, et al. (2013) Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog* 9: e1003211. doi: [10.1371/journal.ppat.1003211](#) PMID: [23516360](#)
12. Colin L, Van Lint C (2009) Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology* 6: 111. doi: [10.1186/1742-4690-6-111](#) PMID: [19961595](#)

13. McKernan LN, Momjian D, Kulkosky J (2012) Protein Kinase C: One Pathway towards the Eradication of Latent HIV-1 Reservoirs. *Adv Virol* 2012: 805347. doi: [10.1155/2012/805347](https://doi.org/10.1155/2012/805347) PMID: [22500169](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22500169/)
14. Van Lint C, Bouchat S, Marcello A (2013) HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* 10: 67. doi: [10.1186/1742-4690-10-67](https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-67) PMID: [23803414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23803414/)
15. Bocklandt S, Blumberg PM, Hamer DH (2003) Activation of latent HIV-1 expression by the potent anti-tumor promoter 12-deoxyphorbol 13-phenylacetate. *Antiviral Res* 59: 89–98. PMID: [12895692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12895692/)
16. Biancotto A, Grivel JC, Gondois-Rey F, Bettendorfer L, Vigne R, et al. (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. PMID: [15367617](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15367617/)
17. Kulkosky J, Culnan DM, Roman J, Domadula G, Schnell M, et al. (2001) Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood* 98: 3006–3015. PMID: [11698284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11698284/)
18. Korin YD, Brooks DG, Brown S, Korotzer A, Zack JA (2002) Effects of prostratin on T-cell activation and human immunodeficiency virus latency. *J Virol* 76: 8118–8123. PMID: [12134017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12134017/)
19. Williams SA, Chen LF, Kwon H, Fenard D, Bisgrove D, et al. (2004) Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB. *J Biol Chem* 279: 42008–42017. PMID: [15284245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15284245/)
20. Gulakowski RJ, McMahon JB, Buckheit RW Jr., Gustafson KR, Boyd MR (1997) Antireplicative and anticytopathic activities of prostratin, a non-tumor-promoting phorbol ester, against human immunodeficiency virus (HIV). *Antiviral Res* 33: 87–97. PMID: [9021050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9021050/)
21. Perez M, de Vinuesa AG, Sanchez-Duffhues G, Marquez N, Bellido ML, et al. (2010) Bryostatins synergizes with histone deacetylase inhibitors to reactivate HIV-1 from latency. *Curr HIV Res* 8: 418–429. PMID: [20636281](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20636281/)
22. Mehla R, Bivalkar-Mehla S, Zhang R, Handy I, Albrecht H, et al. (2010) Bryostatin modulates latent HIV-1 infection via PKC and AMPK signaling but inhibits acute infection in a receptor independent manner. *PLoS One* 5: e11160. doi: [10.1371/journal.pone.0011160](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011160) PMID: [20585398](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20585398/)
23. Kollar P, Rajchard J, Balounova Z, Pazourek J (2014) Marine natural products: bryostatins in preclinical and clinical studies. *Pharm Biol* 52: 237–242. doi: [10.3109/13880209.2013.804100](https://doi.org/10.3109/13880209.2013.804100) PMID: [24033119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24033119/)
24. Grant S, Roberts J, Poplin E, Tombes MB, Kyle B, et al. (1998) Phase Ib trial of bryostatin 1 in patients with refractory malignancies. *Clin Cancer Res* 4: 611–618. PMID: [9533528](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9533528/)
25. Abreu CM, Price SL, Shirk EN, Cunha RD, Pianowski LF, et al. (2014) Dual role of novel ingenol derivatives from *Euphorbia tirucalli* in HIV replication: inhibition of de novo infection and activation of viral LTR. *PLoS One* 9: e97257. doi: [10.1371/journal.pone.0097257](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097257) PMID: [24827152](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24827152/)
26. Jiang G, Mendes EA, Kaiser P, Sankaran-Walters S, Tang Y, et al. (2014) Reactivation of HIV latency by a newly modified Ingenol derivative via protein kinase Cdelta-NF-kappaB signaling. *AIDS* 28: 1555–1566. doi: [10.1097/QAD.000000000000289](https://doi.org/10.1097/QAD.000000000000289) PMID: [24804860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24804860/)
27. Pandelo Jose D, Bartholomeeusen K, da Cunha RD, Abreu CM, Glinski J, et al. (2014) Reactivation of latent HIV-1 by new semi-synthetic ingenol esters. *Virology* 462–463: 328–339. doi: [10.1016/j.virol.2014.05.033](https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.05.033) PMID: [25014309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25014309/)
28. Mbonye UR, Wang B, Gokulrangan G, Chance MR, Karn J (2015) Phosphorylation of HEXIM1 at Tyr271 and Tyr274 Promotes Release of P-TEFb from the 7SK snRNP Complex and Enhances Proviral HIV Gene Expression. *Proteomics* 15: 2078–2086. doi: [10.1002/prot.201500038](https://doi.org/10.1002/prot.201500038) PMID: [25900325](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25900325/)
29. Karn J, Stoltzfus CM (2012) Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a006916. doi: [10.1101/cshperspect.a006916](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006916) PMID: [22355797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22355797/)
30. Sobhian B, Laguette N, Yatim A, Nakamura M, Levy Y, et al. (2010) HIV-1 Tat assembles a multifunctional transcription elongation complex and stably associates with the 7SK snRNP. *Mol Cell* 38: 439–451. doi: [10.1016/j.molcel.2010.04.012](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.012) PMID: [20471949](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20471949/)
31. Bartholomeeusen K, Xiang Y, Fujinaga K, Peterlin BM (2012) Bromodomain and extra-terminal (BET) bromodomain inhibition activate transcription via transient release of positive transcription elongation factor b (P-TEFb) from 7SK small nuclear ribonucleoprotein. *J Biol Chem* 287: 36609–36616. doi: [10.1074/jbc.M112.410746](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.410746) PMID: [22952229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22952229/)
32. Li Z, Guo J, Wu Y, Zhou Q (2013) The BET bromodomain inhibitor JQ1 activates HIV latency through antagonizing Brd4 inhibition of Tat-transactivation. *Nucleic Acids Res* 41: 277–287. doi: [10.1093/nar/gks976](https://doi.org/10.1093/nar/gks976) PMID: [23087374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23087374/)
33. Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, et al. (2008) Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319: 921–926. doi: [10.1126/science.1152725](https://doi.org/10.1126/science.1152725) PMID: [18187620](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18187620/)

34. Banerjee C, Archin N, Michaels D, Belkina AC, Denis GV, et al. (2012) BET bromodomain inhibition as a novel strategy for reactivation of HIV-1. *J Leukoc Biol* 92: 1147–1154. doi: [10.1189/jlb.0312165](https://doi.org/10.1189/jlb.0312165) PMID: [22802445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22802445/)
35. Boehm D, Calvanese V, Dar RD, Xing S, Schroeder S, et al. (2013) BET bromodomain-targeting compounds reactivate HIV from latency via a Tat-independent mechanism. *Cell Cycle* 12: 452–462. doi: [10.4161/cc.23309](https://doi.org/10.4161/cc.23309) PMID: [23255218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23255218/)
36. Zhu J, Gaiha GD, John SP, Pertel T, Chin CR, et al. (2012) Reactivation of latent HIV-1 by inhibition of BRD4. *Cell Rep* 2: 807–816. doi: [10.1016/j.celrep.2012.09.008](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.09.008) PMID: [23041316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23041316/)
37. Contreras X, Barboric M, Lenasi T, Peterlin BM (2007) HMBA releases P-TEFb from HEXIM1 and 7SK snRNA via PI3K/Akt and activates HIV transcription. *PLoS Pathog* 3: 1459–1469. PMID: [17937499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17937499/)
38. Sung TL, Rice AP (2006) Effects of prostratin on Cyclin T1/P-TEFb function and the gene expression profile in primary resting CD4+ T cells. *Retrovirology* 3: 66. PMID: [17014716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17014716/)
39. Bartholomeeusen K, Fujinaga K, Xiang Y, Peterlin BM (2013) Histone deacetylase inhibitors (HDACis) that release the positive transcription elongation factor b (P-TEFb) from its inhibitory complex also activate HIV transcription. *J Biol Chem* 288: 14400–14407. doi: [10.1074/jbc.M113.464834](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.464834) PMID: [23539624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23539624/)
40. Fujinaga K, Barboric M, Li Q, Luo Z, Price DH, et al. (2012) PKC phosphorylates HEXIM1 and regulates P-TEFb activity. *Nucleic Acids Res* 40: 9160–9170. doi: [10.1093/nar/gks682](https://doi.org/10.1093/nar/gks682) PMID: [22821562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22821562/)
41. Wires ES, Alvarez D, Dobrowolski C, Wang Y, Morales M, et al. (2012) Methamphetamine activates nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kappaB) and induces human immunodeficiency virus (HIV) transcription in human microglial cells. *J Neurovirol* 18: 400–410. doi: [10.1007/s13365-012-0103-4](https://doi.org/10.1007/s13365-012-0103-4) PMID: [22618514](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22618514/)
42. Kutsch O, Vey T, Kerkau T, Hunig T, Schimpl A (2002) HIV type 1 abrogates TAP-mediated transport of antigenic peptides presented by MHC class I. Transporter associated with antigen presentation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 1319–1325. PMID: [12487820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12487820/)
43. Matzuk MM, McKeown MR, Filippakopoulos P, Li Q, Ma L, et al. (2012) Small-molecule inhibition of BRDT for male contraception. *Cell* 150: 673–684. PMID: [22901802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22901802/)
44. Spina CA, Anderson J, Archin NM, Bosque A, Chan J, et al. (2013) An in-depth comparison of latent HIV-1 reactivation in multiple cell model systems and resting CD4+ T cells from aviremic patients. *PLoS Pathog* 9: e1003834. doi: [10.1371/journal.ppat.1003834](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003834) PMID: [24385908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24385908/)
45. Cillo AR, Sobolewski MD, Bosch RJ, Fyne E, Piatak M Jr., et al. (2014) Quantification of HIV-1 latency reversal in resting CD4+ T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 7078–7083. doi: [10.1073/pnas.1402873111](https://doi.org/10.1073/pnas.1402873111) PMID: [24706775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24706775/)
46. Pavlick AC, Wu J, Roberts J, Rosenthal MA, Hamilton A, et al. (2009) Phase I study of bryostatin 1, a protein kinase C modulator, preceding cisplatin in patients with refractory non-hematologic tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 64: 803–810. doi: [10.1007/s00280-009-0931-y](https://doi.org/10.1007/s00280-009-0931-y) PMID: [19221754](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19221754/)
47. Morgan RJ Jr., Leong L, Chow W, Gandara D, Frankel P, et al. (2012) Phase II trial of bryostatin-1 in combination with cisplatin in patients with recurrent or persistent epithelial ovarian cancer: a California cancer consortium study. *Invest New Drugs* 30: 723–728. doi: [10.1007/s10637-010-9557-5](https://doi.org/10.1007/s10637-010-9557-5) PMID: [20936324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20936324/)
48. Liu P, Xiang Y, Fujinaga K, Bartholomeeusen K, Nilson KA, et al. (2014) Release of positive transcription elongation factor b (P-TEFb) from 7SK small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) activates hexamethylene bisacetamide-inducible protein (HEXIM1) transcription. *J Biol Chem* 289: 9918–9925. doi: [10.1074/jbc.M113.539015](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.539015) PMID: [24515107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24515107/)
49. Fujinaga K, Luo Z, Schaufele F, Peterlin BM (2015) Visualization of positive transcription elongation factor b (P-TEFb) activation in living cells. *J Biol Chem* 290: 1829–1836. doi: [10.1074/jbc.M114.605816](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.605816) PMID: [25492871](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25492871/)
50. Budhiraja S, Famiglietti M, Bosque A, Planelles V, Rice AP (2013) Cyclin T1 and CDK9 T-loop phosphorylation are downregulated during establishment of HIV-1 latency in primary resting memory CD4+ T cells. *J Virol* 87: 1211–1220. doi: [10.1128/JVI.02413-12](https://doi.org/10.1128/JVI.02413-12) PMID: [23152527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23152527/)
51. Chiang K, Rice AP (2012) MicroRNA-mediated restriction of HIV-1 in resting CD4+ T cells and monocytes. *Viruses* 4: 1390–1409. doi: [10.3390/v4091390](https://doi.org/10.3390/v4091390) PMID: [23170164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23170164/)
52. Chiang K, Sung TL, Rice AP (2012) Regulation of cyclin T1 and HIV-1 Replication by microRNAs in resting CD4+ T lymphocytes. *J Virol* 86: 3244–3252. doi: [10.1128/JVI.05065-11](https://doi.org/10.1128/JVI.05065-11) PMID: [22205749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22205749/)
53. Hoque M, Shamanna RA, Guan D, Pe'ery T, Mathews MB (2011) HIV-1 replication and latency are regulated by translational control of cyclin T1. *J Mol Biol* 410: 917–932. doi: [10.1016/j.jmb.2011.03.060](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.060) PMID: [21763496](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21763496/)

54. McNamara RP, McCann JL, Gudipaty SA, D'Orso I (2013) Transcription factors mediate the enzymatic disassembly of promoter-bound 7SK snRNP to locally recruit P-TEFb for transcription elongation. *Cell Rep* 5: 1256–1268. doi: [10.1016/j.celrep.2013.11.003](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.003) PMID: [24316072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24316072/)
55. Zou Z, Huang B, Wu X, Zhang H, Qi J, et al. (2014) Brd4 maintains constitutively active NF-kappaB in cancer cells by binding to acetylated RelA. *Oncogene* 33: 2395–2404. doi: [10.1038/onc.2013.179](https://doi.org/10.1038/onc.2013.179) PMID: [23686307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23686307/)
56. Calao M, Burny A, Quivy V, Dekoninck A, Van Lint C (2008) A pervasive role of histone acetyltransferases and deacetylases in an NF-kappaB-signaling code. *Trends Biochem Sci* 33: 339–349. doi: [10.1016/j.tibs.2008.04.015](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.04.015) PMID: [18585916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18585916/)
57. Cherrier T, Le Douce V, Eilebrecht S, Riclet R, Marban C, et al. (2013) CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 12655–12660. doi: [10.1073/pnas.1220136110](https://doi.org/10.1073/pnas.1220136110) PMID: [23852730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23852730/)
58. Eilebrecht S, Le Douce V, Riclet R, Targat B, Hallay H, et al. (2014) HMGA1 recruits CTIP2-repressed P-TEFb to the HIV-1 and cellular target promoters. *Nucleic Acids Res* 42: 4962–4971. doi: [10.1093/nar/gku168](https://doi.org/10.1093/nar/gku168) PMID: [24623795](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24623795/)
59. Dar RD, Hosmane NN, Arkin MR, Siliciano RF, Weinberger LS (2014) Screening for noise in gene expression identifies drug synergies. *Science* 344: 1392–1396. doi: [10.1126/science.1250220](https://doi.org/10.1126/science.1250220) PMID: [24903562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24903562/)
60. Spivak AM, Andrade A, Eisele E, Hoh R, Bacchetti P, et al. (2014) A pilot study assessing the safety and latency-reversing activity of disulfiram in HIV-1-infected adults on antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 58: 883–890. doi: [10.1093/cid/cit813](https://doi.org/10.1093/cid/cit813) PMID: [24336828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24336828/)
61. Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, Choudhary SK, Kuruc JD, et al. (2012) Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 487: 482–485. doi: [10.1038/nature11286](https://doi.org/10.1038/nature11286) PMID: [22837004](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22837004/)
62. Kumar A, Abbas W, Herbein G (2014) HIV-1 latency in monocytes/macrophages. *Viruses* 6: 1837–1860. doi: [10.3390/v6041837](https://doi.org/10.3390/v6041837) PMID: [24759213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24759213/)
63. Bullen CK, Laird GM, Durand CM, Siliciano JD, Siliciano RF (2014) New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nat Med* 20: 425–429. doi: [10.1038/nm.3489](https://doi.org/10.1038/nm.3489) PMID: [24658076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24658076/)
64. Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, et al. (2013) Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 155: 540–551. doi: [10.1016/j.cell.2013.09.020](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.020) PMID: [24243014](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24243014/)
65. Reuse S, Calao M, Kabeya K, Guiguen A, Gatot JS, et al. (2009) Synergistic activation of HIV-1 expression by deacetylase inhibitors and prostratin: implications for treatment of latent infection. *PLoS One* 4: e6093. doi: [10.1371/journal.pone.0006093](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006093) PMID: [19564922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19564922/)
66. Bouchat S, Gatot JS, Kabeya K, Cardona C, Colin L, et al. (2012) Histone methyltransferase inhibitors induce HIV-1 recovery in resting CD4(+) T cells from HIV-1-infected HAART-treated patients. *AIDS* 26: 1473–1482. doi: [10.1097/QAD.0b013e32835535f5](https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32835535f5) PMID: [22555163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22555163/)
67. Hezareh M, Moukil MA, Szanto I, Ponderzewski M, Mouche S, et al. (2004) Mechanisms of HIV receptor and co-receptor down-regulation by prostratin: role of conventional and novel PKC isoforms. *Antivir Chem Chemother* 15: 207–222. PMID: [15457682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15457682/)
68. Weitman S, Langevin AM, Berkow RL, Thomas PJ, Hurwitz CA, et al. (1999) A Phase I trial of bryostatin-1 in children with refractory solid tumors: a Pediatric Oncology Group study. *Clin Cancer Res* 5: 2344–2348. PMID: [10499603](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10499603/)
69. Lebwohl M, Shumack S, Stein Gold L, Melgaard A, Larsson T, et al. (2013) Long-term follow-up study of ingenol mebutate gel for the treatment of actinic keratoses. *JAMA Dermatol* 149: 666–670. doi: [10.1001/jamadermatol.2013.2766](https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2013.2766) PMID: [23553119](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23553119/)
70. Tang Y, Gholamin S, Schubert S, Willardson MI, Lee A, et al. (2014) Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition. *Nat Med* 20: 732–740. doi: [10.1038/nm.3613](https://doi.org/10.1038/nm.3613) PMID: [24973920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24973920/)
71. Venkataraman S, Alimova I, Balakrishnan I, Harris P, Birks DK, et al. (2014) Inhibition of BRD4 attenuates tumor cell self-renewal and suppresses stem cell signaling in MYC driven medulloblastoma. *Oncotarget* 5: 2355–2371. PMID: [24796395](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24796395/)
72. Belkina AC, Nikolajczyk BS, Denis GV (2013) BET protein function is required for inflammation: Brd2 genetic disruption and BET inhibitor JQ1 impair mouse macrophage inflammatory responses. *J Immunol* 190: 3670–3678. doi: [10.4049/jimmunol.1202838](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202838) PMID: [23420887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23420887/)
73. Deng K, Perteaux M, Rongvaux A, Wang L, Durand CM, et al. (2015) Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations. *Nature* 517: 381–385. doi: [10.1038/nature14053](https://doi.org/10.1038/nature14053) PMID: [25561180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25561180/)

74. Laird GM, Bullen CK, Rosenbloom DI, Martin AR, Hill AL, et al. (2015) Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *J Clin Invest* 125: 1901–1912. doi: [10.1172/JCI80142](https://doi.org/10.1172/JCI80142) PMID: [25822022](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25822022/)
75. Avettand-Fenoel V, Chaix ML, Blanche S, Burgard M, Floch C, et al. (2009) LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol* 81: 217–223. doi: [10.1002/jmv.21390](https://doi.org/10.1002/jmv.21390) PMID: [19107966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19107966/)

Publication 2 (en préparation)

KAP1 : un nouveau facteur répresseur de la transcription du VIH-1

Résumé

La latence post-intégrative du VIH-1 génère des réservoirs qui empêchent l'éradication du virus avec les traitements actuels. Nous avons démontré que le répresseur transcriptionnel CTIP2 recrute des complexes multi-enzymatiques pour favoriser l'établissement et la persistance de la latence du VIH-1 dans les cellules microgliales qui constituent le principal réservoir viral du système nerveux central (Marban et al., 2007). Le contrôle du transactivateur du VIH-1 Tat est crucial pour la persistance de ces réservoirs à longue durée de vie. Dans le présent travail, les protéines partenaires du CTIP2 ont été étudiées. Des extraits de protéines nucléaires de cellules HEK exprimant flag-CTIP2 ont été soumis à une immunoprécipitation en utilisant un anticorps anti-flag. Les protéines co-immunoprécipitées ont été identifiées par spectrométrie de masse quantitative. 888 protéines interagissant avec CTIP2 ($p < 0,05$) ont été identifiées, y compris le facteur de régulation de la transcription, KAP1. Les fonctions de KAP1 sont étroitement liées aux régulations post-traductionnelles médiées par la voie SUMO. Nos résultats suggèrent que KAP1 induit une dégradation de Tat par le protéasome via une voie sensible à SUMO. En effet, privilégier la sumoylation favorise l'association de Tat avec KAP1 de même que sa dégradation. Logiquement, la surexpression de la SUMO protéase SENP1 annule la dégradation de Tat induite par KAP1. Il a été démontré que KAP1 contrôle l'expression des gènes viraux et la latence virale du KSHV, du MLV et du HTLV-1 (Chang et al., 2009a; Wolf et al., 2008a, 2008b). Nous avons constaté que le répresseur transcriptionnel KAP1 contribue à l'inactivation du gène du VIH-1 en réprimant les étapes de transcription virale. KAP1 inhibe également l'activité transcriptionnelle médiée par Tat. De plus, nous avons montré que KAP1 coopère avec CTIP2 pour inhiber la transcription du VIH-1 et l'expression virale. Globalement, nos résultats suggèrent que KAP1 contribue à l'établissement et à la persistance des réservoirs de VIH-1 infectés de manière latente. Ces résultats suggèrent que le ciblage des voies SUMO pourrait constituer un nouveau champ d'investigation afin de développer de nouvelles classes d'agents d'inversion de latence pour les stratégies de traitement du VIH-1.

1- Identification des complexes associés à BCL11b/CTIP2 par spectrométrie de masse quantitative

Des expériences d'immunoprécipitations de BCL11b/CTIP2, couplées à la spectrométrie de masse, nous ont permis d'identifier 888 interactants de CTIP2, en fixant la valeur $p < 0,05$, qui reflète la significativité d'interaction avec CTIP2 par rapport au contrôle. Parmi les ontologies de ces facteurs cellulaires, on trouve ceux de la division cellulaire, l'adhésion cellule-cellule, la réparation, la réplication et la transcription du DNA, l'activité hélicase, la déacétylation des histones, l'épissage des mRNA, la liaison aux nucléotides et la prise en charge des RNA ribosomiaux. Nous avons trouvé les protéines précédemment décrites pour interagir avec CTIP2, comme P-TEFb, HEXIM1, HDAC et le complexe NURD avec ses sous-unités CHD3/4, MBD2/3 et MTA2, ce qui valide notre approche. Nous avons, en plus, caractérisé de nouveaux partenaires de CTIP2. Nous avons ainsi identifié un ensemble de facteurs cellulaires qui contribuent aux régulations post-traductionnelles par sumoylation dont KAP1/TRIM28. Nous avons, également, deux SUMO protéases : SENP1 et SENP3 et des SUMO E3 ligases : NSMCE2 et RanBP2, (**figure 1**).

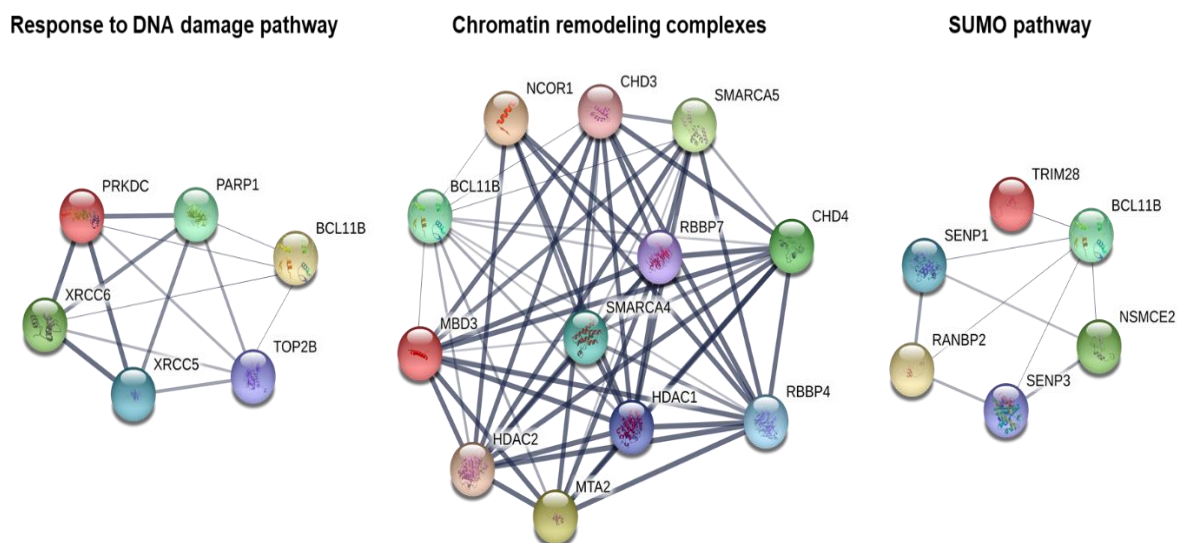


Figure 1 : Réseau d'association fonctionnelle de certains des partenaires identifiés de CTIP2. Les partenaires de CTIP2 ont été classés en fonction de leurs ontologies géniques à l'aide de DAVID bioinformatics resource. Les interactions entre les protéines de la réponse aux dommages de DNA, de remodelage de la chromatine et de la voie SUMO, ont été présentées à l'aide de la base de données String.

Nous avons orienté notre travail, principalement, sur KAP1, en raison de ses nombreuses similarités avec CTIP2. Notamment, CTIP2 et KAP1 ont des capacités de répresseurs de gènes à travers de leur interaction avec le complexe NuRD. Ces 2 facteurs interagissent avec les

protéines de la voie SUMO, avec les enzymes de réparation du DNA comme PARP1 et PRKDC (Quénet et al., 2008; Tomimatsu et al., 2009) et sont capables de réguler le gène *p21*.

2- Validation de l'interaction entre CTIP2 et KAP1

L'interaction entre CTIP2 et KAP1, observée en spectrométrie de masse, a été validée par immunoprécipitation de CTIP2 en présence ou non de traitements à la RNase. Sur la **figure 2 A colonne 4**, KAP1 co-immunoprécipite avec CTIP2. Cette interaction est maintenue après traitement à la RNase ; elle est, donc, indépendante des RNA cellulaires dont le 7SK, (**figure 2 A, colonne 6**). Des résultats similaires ont été obtenus après immunoprécipitation de KAP1, (**figure 2 B, colonnes 8 et 10**). L'interaction entre CTIP2 et KAP1 endogènes a été validée dans le modèle de cellules microgliales, (**figure 2 C**).

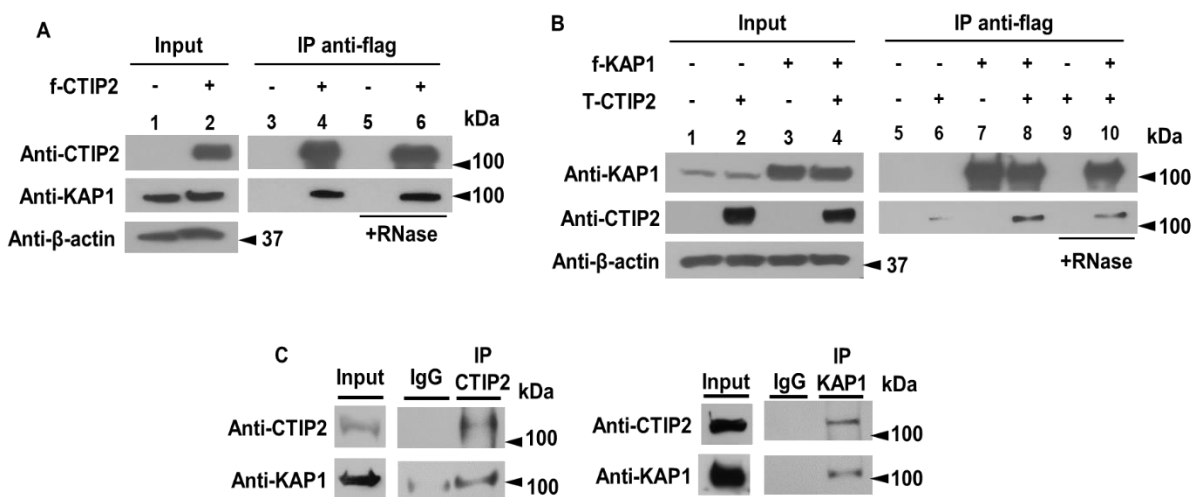


Figure 2 : CTIP2 interagit avec KAP1 de façon indépendante aux RNAs. (A, B) Les cellules HEK ont été transfectées avec flag-CTIP2 ou flag-KAP1. 48 heures post-transfection, les extraits de protéines nucléaires, traités ou non à la RNase, ont été soumis à une immunoprécipitation avec l'anticorps flag. Les complexes immunoprécipités ont été testés par Western blot pour vérifier la présence de KAP1 (A) et CTIP2 (B). (C) Les extraits de protéines nucléaires des cellules microgliales ont été analysés par Western blot pour examiner l'expression de CTIP2 et KAP1 et soumis à une immunoprécipitation avec les anticorps CTIP2 et KAP1. Les résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes.

3- Identification des domaines d'interaction entre CTIP2 et KAP1

Par utilisation de différents mutants de délétion de KAP1, nous avons identifié par co-immunoprécipitation le domaine de KAP1 nécessaire à l'interaction avec CTIP2, (**figure 3 A**). CTIP2 interagit avec les mutants Δ PHD, Δ Bromo, Δ PHD/ Δ Bromo, (**figure 3 A, colonnes 10, 11, 12**), mais pas avec le mutant Δ RBCC, (**figure 3 A, colonne 9**). Pour délimiter de façon précise la région de CTIP2 associée à KAP1, nous avons réalisé des expériences de co-

immunoprécipitation de différents mutants de délétions de CTIP2. KAP1 est capable de lier uniquement les mutants : 1-354 et 145-434 de CTIP2 (**figure 3 B, colonnes 11 et 12**).

Ainsi, nos résultats montrent que KAP1 interagit avec CTIP2 par l'intermédiaire du domaine RBCC. Ce domaine impliqué dans le recrutement de KAP1 au promoteur des gènes cibles, pourrait constituer un facteur d'ancrage par lequel CTIP2 recruterait KAP1 sur le promoteur du VIH-1. KAP1 lie CTIP2 au niveau de sa région centrale, qui constitue un des sites par lesquels la protéine virale Tat se lie à CTIP2 (Rohr et al., 2003a). Il est à noter que Tat possède un site supplémentaire de fixation à CTIP2, qui se trouve au niveau de son domaine C-terminal, entre les résidus 717 et 813 (Rohr et al., 2003a).

Pour visualiser l'association de CTIP2 et KAP1 dans le noyau, les cellules microgliales ont été cotransfectées par un vecteur GFP-KAP1 seul, ou en combinaison avec RFP-CTIP2, suivi d'un examen de leur localisation par microscopie confocale. La localisation nucléaire a été réalisée à l'aide d'un marquage au colorant Hoechst. Comme décrit précédemment, KAP1 est, principalement, retrouvé dans le nucléoplasme, avec une petite localisation dans des structures nommées « dot-like », qui sont des régions d'hétérochromatine péricentrique, (**figure 3 C**) (Ryan et al., 1999). CTIP2 a été retrouvée dans des structures nucléaires denses, (**figure 3 D**) (Rohr et al., 2003a). L'expression combinée de KAP1 et CTIP2 montre que ces 2 protéines sont colocalisées à la périphérie de ces structures nucléaires denses, (**figure 3 D**), décrites pour être impliquées dans la répression de l'expression génique.

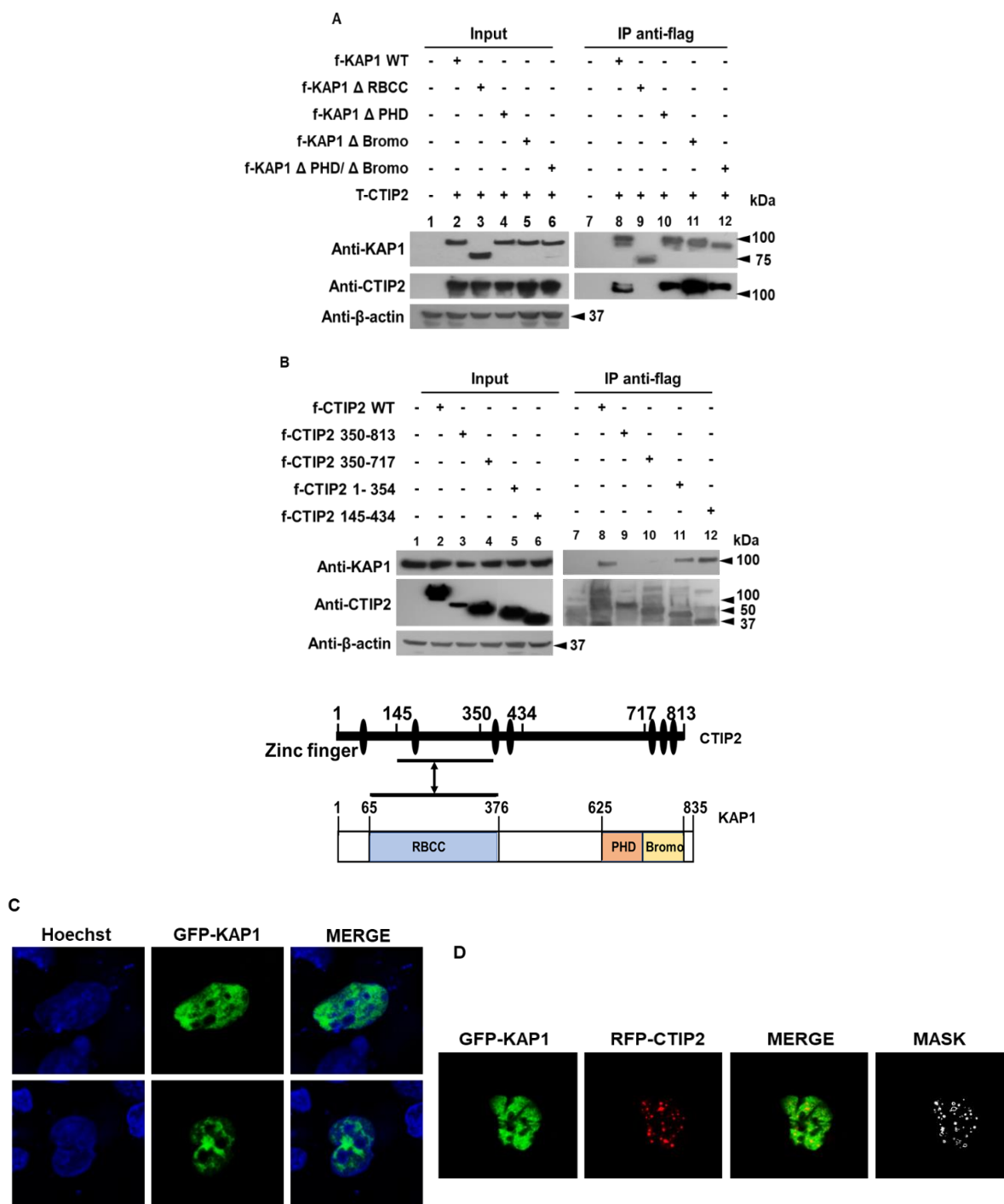


Figure 3 : CTIP2 et KAP1 interagissent, respectivement, par leur domaine central et RBCC et colocalisent à la périphérie des structures nucléaires denses. (A) Les cellules HEK ont été transfectées avec Tap-CTIP2 et un des vecteurs codant pour f-KAP1 non muté (WT : wild type) ou KAP1 délété du domaine RBCC (Δ RBCC), ou PHD (Δ PHD), ou Bromo (Δ Bromo) ou des domaines PHD et Bromo (Δ PHD/ Δ Bromo), ou avec les mutants de délétions de CTIP2, comme indiqué (B). 48 heures après transfection, les extraits de protéines nucléaires ont été soumis à une immunoprécipitation avec l'anticorps flag. Les complexes protéiques élués ont été analysés par Western blot, pour vérifier la présence de CTIP2 et KAP1. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. (C) Les cellules microgliales ont été transfectées avec des vecteurs codant pour GFP-KAP1 seul ou avec RFP-CTIP2 (D) et soumises à des observations au microscope confocal (C, D). Le MASK représente les pixels colocalisés (D).

4- Tat interagit avec KAP1 et entre en compétition avec l'association KAP1-CTIP2

CTIP2 est capable d'inhiber l'étape précoce de la transcription du VIH-1 par sa capacité à recruter des complexes répresseurs tels que HDAC1/2 et Suv39h1 au promoteur viral, mais aussi au travers de sa coopération avec LSD1 et CTIP2 est aussi capable d'interagir avec Tat et d'inhiber son activité transcriptionnelle, notamment en induisant sa relocalisation dans des structures transcriptionnellement inactives de la chromatine. Avec tous ces effets, et au vu de notre identification de KAP1 comme nouveau partenaire de CTIP2, nous nous sommes intéressés à la capacité de KAP1 à interagir avec Tat. Des expériences d'immunoprécipitation, après surexpression de Tat, ont permis de valider, pour la première fois, son interaction avec KAP1, (**figures 4 A et B**). Tat est une protéine présente, à la fois, dans le nucléoplasme et les nucléoles. Nos expériences d'immunofluorescence (IF) ont montré que Tat colocalise avec KAP1 dans le nucléoplasme, (**figure 4 C**).

Nous constatons par des expériences d'immunoprécipitation, réalisées sur des extraits nucléaires où CTIP2 et KAP1 sont surexprimés en présence d'une dose croissante de Tat, que l'interaction entre KAP1 et CTIP2 disparaît de façon dose dépendante à la présence de Tat, (**figure 4 D, colonnes 9 et 10**). Pour conforter ces résultats, nous avons analysé la localisation de ces protéines dans le noyau des cellules microgliales. Nous observons qu'en l'absence d'une surexpression de KAP1, CTIP2 colocalise avec Tat au niveau des structures nucléaires denses, comme décrit précédemment (Rohr et al., 2003a), (**figure 4 E, panel du haut**). Par contre, l'expression de GFP-KAP1 contrecarre cette colocalisation entre CTIP2 et Tat, (**figure 4 E, panel du bas**). Il en est de même pour la colocalisation de KAP1 et CTIP2, qui se trouve défavorisée en présence de Tat.

Nos résultats suggèrent que CTIP2 et KAP1 colocalisent dans les noyaux de cellules non infectées. De même, Tat pourrait colocaliser avec les deux protéines. Par contre, l'interaction de Tat avec KAP1 défavoriserait l'association de ce dernier avec CTIP2. Il existerait, donc, une dynamique de formation des complexes CTIP2/KAP1 dépendante du niveau de Tat et, donc, du niveau d'expression du VIH-1.

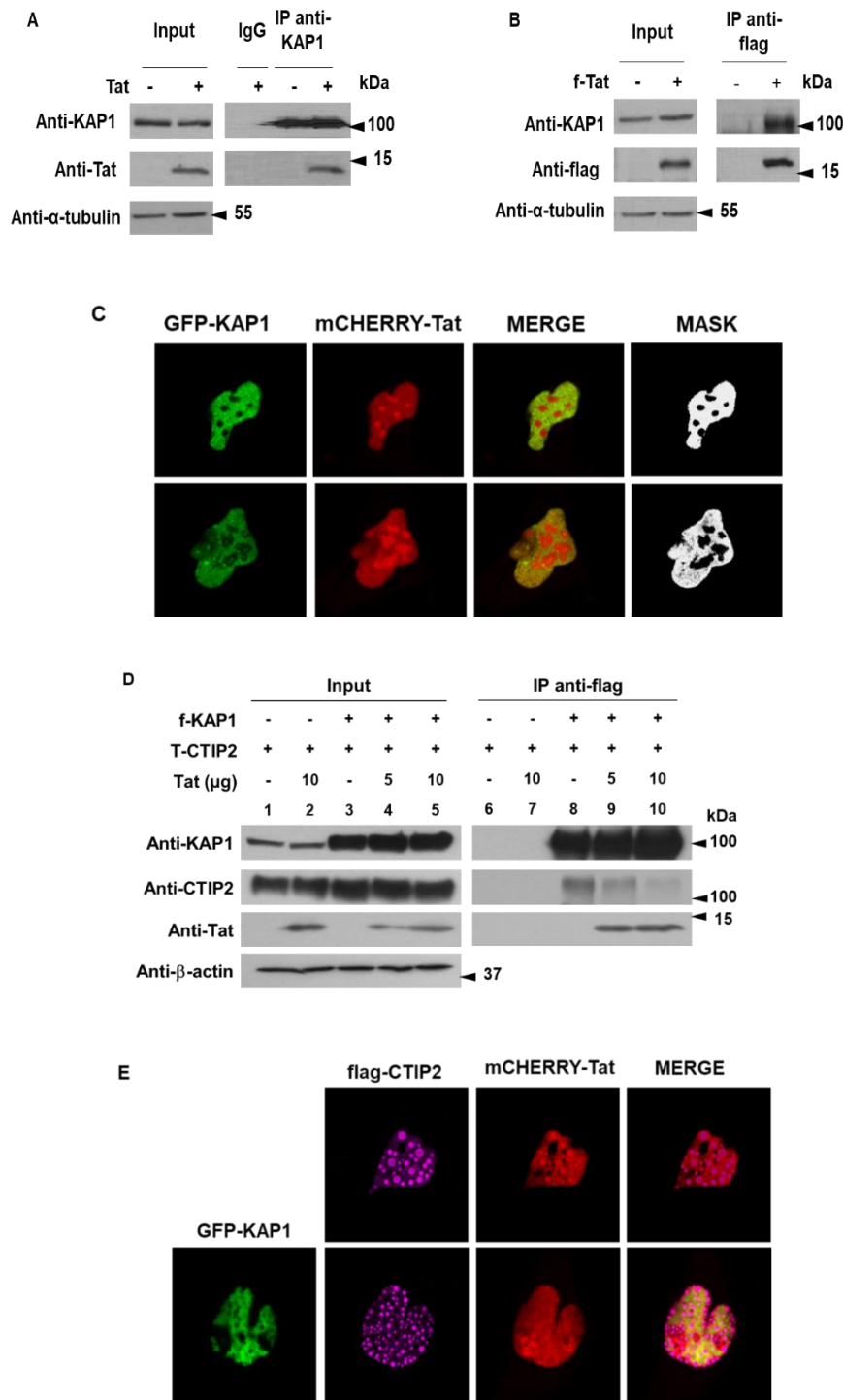


Figure 4 : Tat interagit et colocalise avec KAP1 et entre en compétition avec l'association KAP1/CTIP2. (A, B) Les cellules HEK ont été transfectées avec des vecteurs codant pour la protéine Tat seule ou en présence de flag-KAP1 et Tap-CTIP2 (D). Après 48 heures de transfection, les extraits de protéines nucléaires ont été soumis à une immunoprécipitation avec les anticorps KAP1 (A) et flag (B, D), et les complexes protéiques élués ont été analysés par Western blot pour la présence des protéines indiquées (A, B, D). Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes (A, B, D). (C) Les cellules microgliales ont été transfectées avec les vecteurs indiqués et soumises à des observations au microscope confocal. (C) Le MASK représente les pixels colocalisés. (E) Les cellules microgliales ont été transfectées avec les vecteurs indiqués et soumises ou non à un immunomarquage avec des anticorps flag, avant d'être observées au microscope confocal.

5- KAP1 induit la dégradation de Tat par la voie du protéasome

Par ailleurs, dans le but de comprendre l'intérêt de l'interaction KAP1/Tat, nous avons étudié par Western blot les niveaux d'expression de la protéine virale Tat, en présence d'une dose croissante de KAP1. Nous avons remarqué que KAP1 diminue l'expression de Tat de façon dose dépendante, (**figure 5 A**). Logiquement, la déplétion de KAP1 favorise l'expression de Tat dans la cellule, (**figure 5 B**). Pour déterminer si ce changement d'expression résulte d'un contrôle transcriptionnel, nous avons examiné les mRNA de Tat par des analyses de transcription inverse, suivies de PCR quantitative, en présence ou non de KAP1. La quantité des mRNA, exprimant Tat, est restée inchangée, en présence et en l'absence de KAP1, (**figure 5 C**). Nous avons, par conséquent, émis l'hypothèse que Tat soit dégradée par KAP1, suite à des modifications post-traductionnelles. L'un des mécanismes de dégradation des protéines dans les cellules eucaryotes implique la voie de l'ubiquitine-protéasome, où la modification des protéines par l'ubiquitine est reconnue par le protéasome 26s, qui conduit à leur dégradation. Il a été montré, précédemment, que Tat pouvait être modifiée par ubiquitination sur la K48 et être orientée vers une dégradation par le protéasome (Zhang et al., 2014).

De plus, il est bien établi que KAP1 possède une activité E3 ubiquitine ligase capable d'ubiquitiner p53 et de l'entraîner vers une dégradation par le protéasome (Doyle et al., 2010). Pour confirmer si la diminution de Tat en présence de KAP1 est liée à une dégradation par le protéasome, nous avons quantifié par Western blot l'expression de Tat en présence ou non de KAP1 et de l'inhibiteur du protéasome le MG132, (**figure 5 D**). Comme attendu, en absence de MG132, KAP1 entraîne une réduction significative de la quantité de Tat exprimée, (**figure 5 D, colonne 1 versus 2**). Le niveau d'expression de Tat augmente lorsque les cellules sont traitées au MG132, ce qui suggère une stabilisation de la protéine par inhibition de la voie du protéasome, (**figure 5 D, colonne 1 versus 3**). De plus, le MG132 contrecarre la dégradation de Tat induite par KAP1, (**figure 5 D, colonne 2 versus 4**).

Ainsi nos résultats montrent que KAP1 dégrade le transactivateur Tat, qui est indispensable à l'expression du VIH-1.

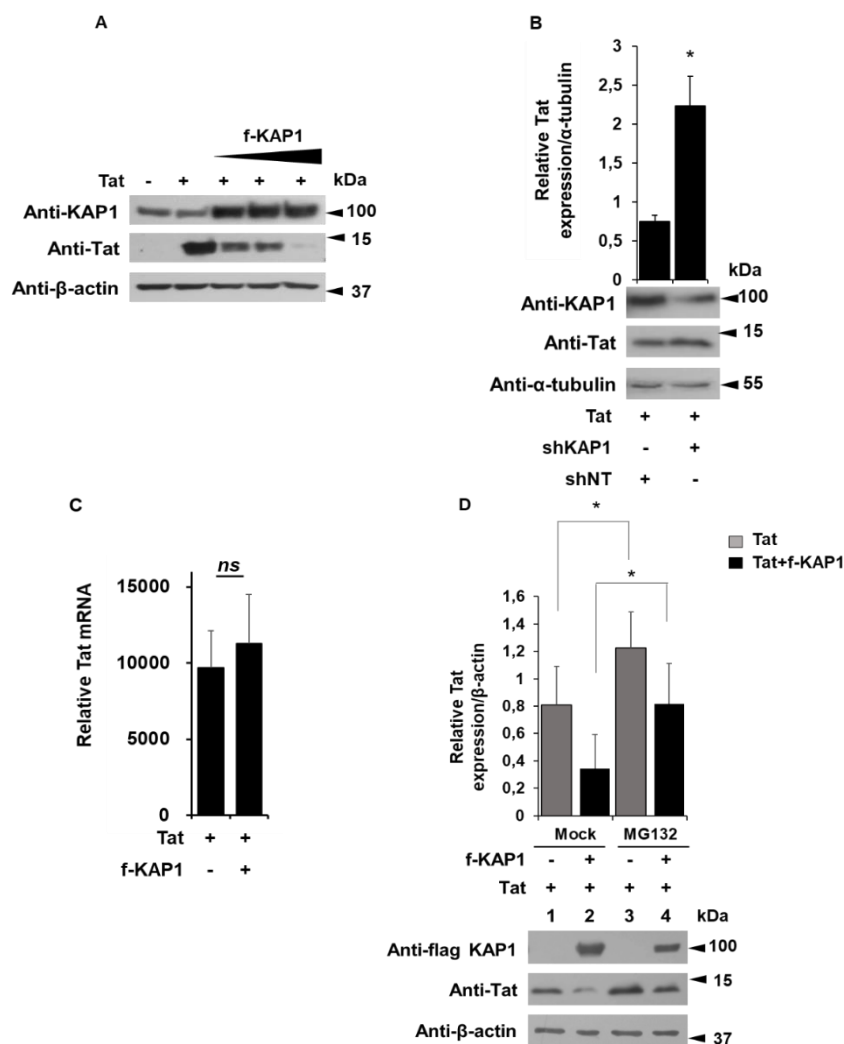


Figure 5 : KAP1 dégrade Tat par la voie du protéasome. (A, B) Les cellules HEK ont été transfectées avec les vecteurs indiqués et 48 heures plus tard, les protéines nucléaires ont été analysées par Western blot pour examiner la présence de KAP1 et Tat. (B) Le niveau d’expression de Tat dont la quantification relative au niveau de l’ α -tubuline a été réalisée à l’aide du logiciel image J. (C) Les extraits de RNA des cellules HEK transfectées avec les plasmides indiqués ont été soumis à une transcription inverse, suivie d’une PCR quantitative dirigée contre Tat. Le taux relatif de mRNA de Tat a été mesuré par normalisation au gène de la GAPDH. (D) Les cellules HEK ont été transfectées avec le vecteur de Tat seul ou en présence du flag-KAP1. Au bout de 18 heures de transfection, les cellules ont été traitées ou non avec 50 μ M de MG132 pendant 6 heures. 24 heures post-transfection, les extraits protéiques totaux ont été analysés par Western blot pour vérifier la présence de KAP1 et Tat. Les niveaux d’expression de Tat ont été quantifiés et présentés de façon relative à l’expression de la β -actine, à l’aide du logiciel image J. Un t-test a été effectué sur 3 (B, C) et 5 (D) expériences indépendantes (p (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

6- Importance de la voie SUMO dans le contrôle de la dégradation de Tat et de son interaction avec KAP1

Le domaine RBCC de KAP1 possède une activité E3 SUMO ligase capable de sumoyler le facteur de transcription IRF7 et de réduire son activité transcriptionnelle. KAP1 a, également, la capacité d’induire la sumoylation de son domaine Bromo à travers l’activité E3 ligase de son

domaine PHD (Ivanov et al., 2007). Dans le but d'étudier l'importance des voies SUMO dans la dégradation de Tat médiée par KAP1, nous avons quantifié par Western blot les niveaux d'expression de Tat en présence ou pas de KAP1 et d'inhibiteurs de SUMO protéases (SPI) : Iodoacétamide et N-éthylmaléimide. Ces 2 composés ont la capacité de préserver l'état de sumoylation des protéines. Nous avons observé qu'en présence de SPI, Tat est plus fortement dégradé par KAP1, (**figure 6 A, colonne 2 versus 4**). De façon intéressante, l'interaction de Tat avec KAP1 est, significativement, renforcée en présence de SPI, (**figure 6 A, colonne 6 versus 8**). Ceci suggère que des modifications par SUMO semblent être nécessaires pour stabiliser l'interaction de Tat avec KAP1 et promouvoir sa dégradation.

En complément de leur activité d'inhibiteur de SUMO protéase, l'Iodoacétamide et le N-éthylmaléimide ont la capacité de stabiliser l'ubiquitination des protéines en supprimant l'activité des déubiquitinases. Pour démontrer, plus spécifiquement, l'implication de la voie SUMO dans la dégradation de Tat par KAP1, nous avons observé l'effet de la surexpression de la SUMO protéase SENP1 sur l'expression de Tat, (**figure 6 B**). Nous constatons une tendance à la stabilisation de Tat en présence d'une surexpression de SENP1, (**figure 6 B, colonne 2**). De plus, la surexpression de SENP1 contrecarre l'action de KAP1 en inhibant la dégradation de Tat, (**figure 6 B, colonne 5 versus 6**). Ainsi, nos résultats suggèrent que la dégradation de Tat par le protéasome 26S fait intervenir les voies de la sumoylation.

Par utilisation de mutants de délétion des différents domaines de KAP1, et en présence des SPI, nous avons identifié le domaine de KAP1 requis pour la dégradation de Tat, (**figure 6 C**). Le mutant Δ RBCB dégrade Tat de façon similaire à KAP1 non muté, (**figure 6 C, colonnes 2 et 3**). Par contre, Δ PHD/ Δ Bromo ne dégradent plus Tat, (**figure 6 C, colonnes 4, 5 et 6**). Ces résultats ont été corroborés par l'utilisation de 2 mutants ponctuels de KAP1, l'un qui mime une phosphorylation constitutive de la S824 de KAP1 (S824D) et l'autre qui est non phosphorylable (S824A), (**figure 6D**). Pour rappel, la phosphorylation de la Sérine 824 de KAP1 constitue la forme non répressive de cette protéine, qui ne porte plus de résidus SUMO sur son domaine Bromo, et qui a perdu la capacité d'interagir avec les complexes répresseurs NuRD et SETDB1 (Li et al., 2007b). Alors que l'expression du mutant non phosphorylable de KAP1 (S824A) produit une dégradation de Tat, (**figure 6 D, colonne 5**), l'expression de la forme non répressive de KAP1 (S824D) ne dégrade plus Tat, (**figure 6 D, colonne 4**).

Dans l'ensemble, ces résultats soulignent l'implication de la voie SUMO dans la dégradation de Tat par KAP1. De plus, ils suggèrent que la forme répressive de KAP1 est prépondérante dans ce phénomène.

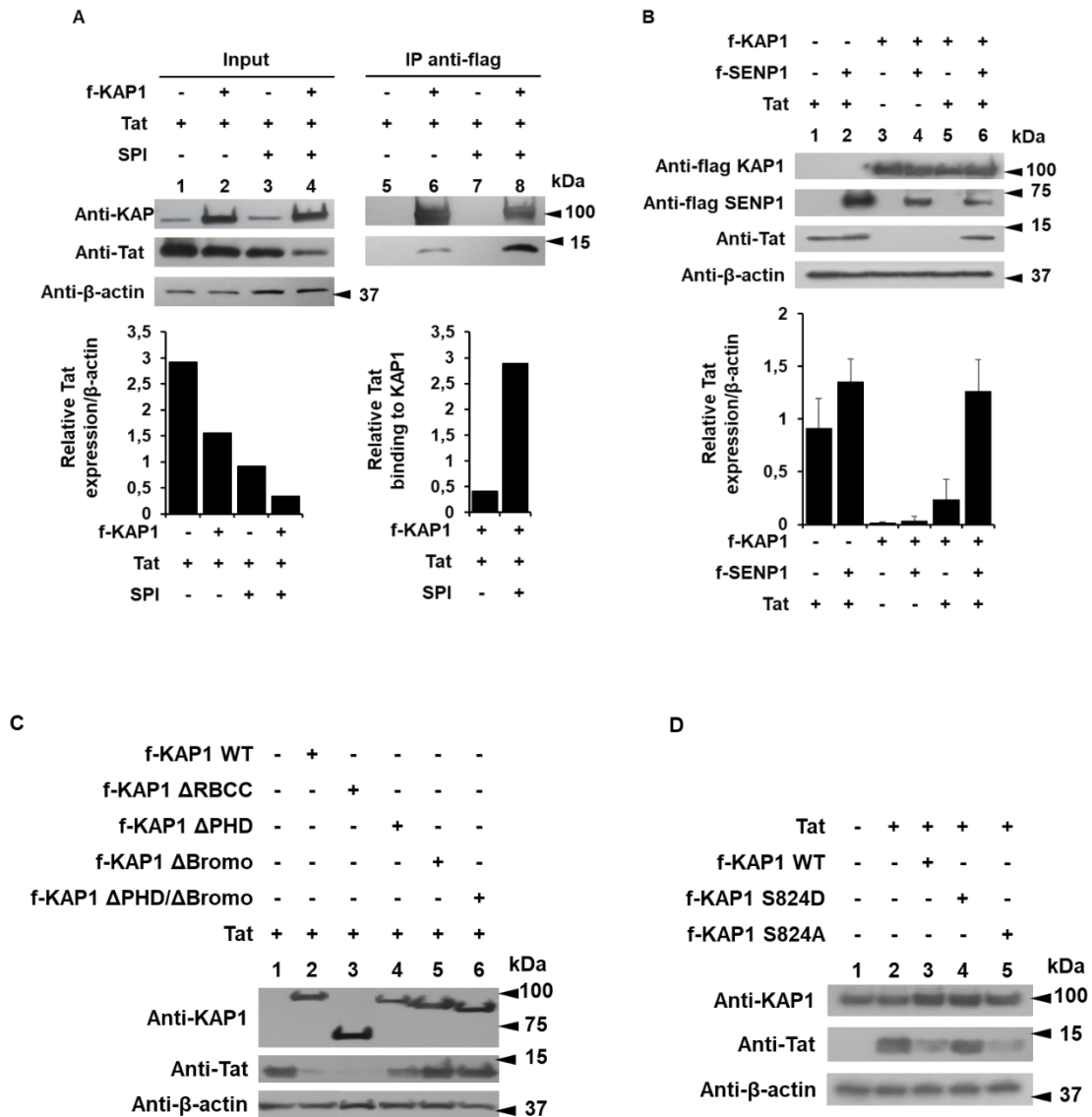


Figure 6 : La dégradation de Tat, de même que son interaction avec KAP1, fait intervenir la voie SUMO et les domaines PHD/Bromo de KAP1. (A) Les cellules HEK ont été transfectées avec les vecteurs indiqués et, 48 heures plus tard, les protéines nucléaires ont été extraites en présence d'inhibiteurs de SUMO protéases (SPI : SUMO Protease Inhibitor, Iodoacétamide et N-éthylmaléimide) et analysées par Western blot, pour examiner la présence de Tat et KAP1. Les protéines nucléaires ont, également, été soumises à une immunoprécipitation avec l'anticorps flag, et les complexes protéiques élués ont été testés par Western blot pour vérifier la présence de KAP1 et Tat. L'expression de Tat a été, quantifiée de façon relative aux niveaux de β-actine ou de KAP1 immunoprécipité, en utilisant le logiciel image J. Cette figure est représentative de 3 expériences indépendantes. (B, C, D) les cellules HEK ont été transfectés comme indiqué. 48 heures plus tard, les protéines nucléaires ont été extraites en présence (C, D) ou pas (B) d'inhibiteurs de SUMO protéases, et testé par western bot pour l'expression des protéines indiquées. (B) L'expression de Tat a été quantifiée par le logiciel image J et normalisée par rapport à la β-actine. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

7- UBC9 induit la dégradation de Tat

Nous montrons que l'inhibition des SUMO protéases facilite la dégradation de Tat par KAP1 et que la surexpression de SENP1 contrecarre cette dégradation. Logiquement, nous avons étudié l'influence d'UBC9, l'unique enzyme de conjugaison des résidus SUMO, sur la stabilité de Tat, (**figure 7**). Nous observons que la surexpression d'UBC9 dans les cellules entraîne la dégradation de Tat, (**figure 7 A**). A l'opposé, la déplétion d'UBC9 augmente l'expression de Tat et empêcherait sa dégradation, (**figure 7 B**). Par des expériences de co-immunoprécipitation, nous avons mis en évidence l'interaction de Tat avec UBC9, (**figure 7 C, colonne 5**). L'interaction de KAP1 avec UBC9 étant connue, elle a été utilisée comme contrôle positif, (**figure 7 C, colonnes 4 et 5**). Pris dans leur globalité, nos résultats suggèrent que KAP1 interagit avec Tat pour entraîner sa sumoylation au travers de l'interaction avec UBC9. L'intervention des domaines PHD et Bromo de KAP1 pourrait favoriser la sumoylation et la dégradation de Tat par le protéasome. Des expériences préliminaires ont été menées pour évaluer l'état de sumoylation de Tat. En présence de la surexpression de Ha-SUMO2, nous avons observé une bande (entre les marqueurs 25 et 37 kDa), qui pourrait correspondre à une forme sumoylée de Tat, (**figure 7 D3, colonne 4**). L'expression de cette forme de Tat est, fortement, réduite en présence de KAP1, (**figure 7 D3, colonne 5**). Dans ces conditions, la surexpression de KAP1 produit bien la dégradation de Tat, (**figure 7 D2, colonne 5**), mais aussi de sa forme sumoylée, (**figure 7 D3, colonne 5**). Enfin, la détection d'Ha-SUMO2 permet de visualiser une protéine sumoylée avec le même profil migratoire que la forme que nous suggérons être Tat sumoylée, (**figure 7 D1, colonne 4**). On notera la présence d'une forme de KAP1 avec une masse moléculaire plus élevée, en présence d'Ha-SUMO2, (**figure 7 D1, colonne 5**). Il pourrait s'agir de la forme sumoylée de KAP1, précédemment décrite (Goodarzi et al., 2011).

Ainsi, les domaines PHD et Bromo de KAP1 entraînent une dégradation de Tat par le protéasome. Nos résultats suggèrent, également, qu'UBC9 interagit avec Tat et que ce dernier pourrait être sumoylé. Cette sumoylation de Tat favoriserait sa dégradation par KAP1.

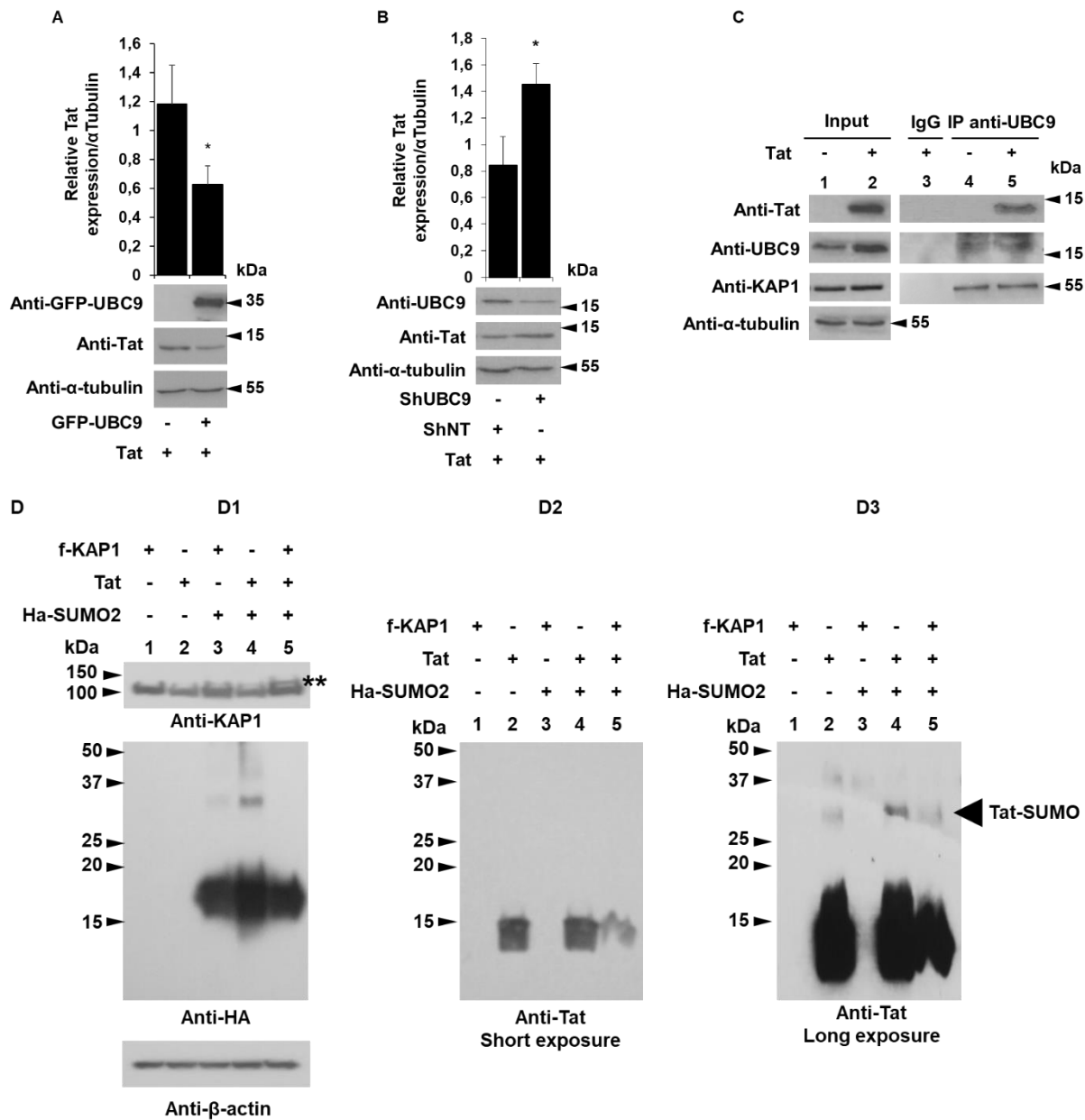


Figure 7 : UBC9 dégrade Tat. (A, B, C) Les cellules HEK ont été transfectées avec les vecteurs indiqués et 48 heures plus tard, les extraits de protéines nucléaires traités avec des inhibiteurs de SUMO protéases ont été analysés par Western blot pour l'expression des protéines indiquées. (A, B) L'expression de Tat a été quantifiée par le logiciel image J et normalisée par rapport à la β -actine. Un t-test a été effectué sur 3 expériences indépendantes (p (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)). (C) Les extraits de protéines nucléaires ont été soumis à une immunoprécipitation avec l'anticorps UBC9 et les protéines éluées ont été analysées par Western blot pour l'expression de Tat, KAP1 et UBC9. **KAP1 dégrade Tat-SUMO.** (D) Les cellules HEK ont été transfectées avec les vecteurs indiqués. 48 heures post-transfection, les protéines nucléaires extraites en présence des inhibiteurs de SUMO protéases ont été analysées par Western blot pour l'expression des protéines indiquées. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. ** représente la forme de KAP1 sumoylé.

8- KAP1 inhibe la phase précoce et tardive Tat dépendante de la transcription du VIH-1

KAP1 est décrit comme un puissant répresseur de gènes. KAP1 joue un rôle critique dans l'inhibition de l'expression des gènes lytiques et dans la latence du KSHV et de l'EBV (Sun et al., 2014). KAP1 réprime, également, la transcription du CMV, MLV et HTLV (Rauwel et al., 2015; Wolf and Goff, 2009).

Pour connaître l'effet global de KAP1 sur l'expression du VIH-1, nous avons transfecté les cellules microgliales avec la construction virale pNL4-3 Δ ENV Luc, en présence de quantités croissantes de KAP1. L'expression du virus est diminuée de façon significative à l'augmentation de KAP1, (**figure 8 A**). En revanche, la déplétion de KAP1 augmente, significativement, l'expression virale, (**figure 8 B**). Ces résultats suggèrent que KAP1 est un répresseur de l'expression du VIH-1 dans les cellules microgliales.

Afin d'identifier les effets de ce facteur sur l'activité transcriptionnelle virale, nous avons transfecté les cellules microgliales avec un vecteur rapporteur LTR-Luciférase, en présence de doses croissantes de KAP1, (**figure 8 C**). L'expression de quantité croissantes de KAP1 inhibe de façon significative et dose dépendante l'étape précoce d'initiation de la transcription des gènes viraux, (**figure 8 C**). Logiquement, la déplétion de KAP1 stimule l'activité du promoteur du VIH-1, (**figure 8 D**). La surexpression d'une quantité croissante de KAP1 de même que sa déplétion ont été validées par western blot, (**figures 8 E et F**).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets de KAP1 sur la phase d'élongation (Tat dépendante) de la transcription des gènes du VIH-1. Cette expérience a été réalisée en présence de doses croissantes de KAP1 et de quantités stables du transactivateur Tat, (**figure 8 G**). Alors que Tat stimule, fortement, l'activité du promoteur viral, (**figure 8 G, colonne 2**), la surexpression de KAP1 réprime de façon significative et dose dépendante cette transactivation, (**figure 8 G, colonnes 3 à 5**). Comme attendu, la déplétion de KAP1 favorise l'activité stimulatrice de Tat, (**figure 8 H**).

Ainsi, nos résultats démontrent, pour la première fois, et de façon directe, que KAP1 est un répresseur de la transcription des gènes du VIH-1 dans les cellules microgliales. KAP1 inhibe la phase précoce d'initiation, comme la phase Tat-dépendante, d'élongation, de la transcription des gènes viraux.

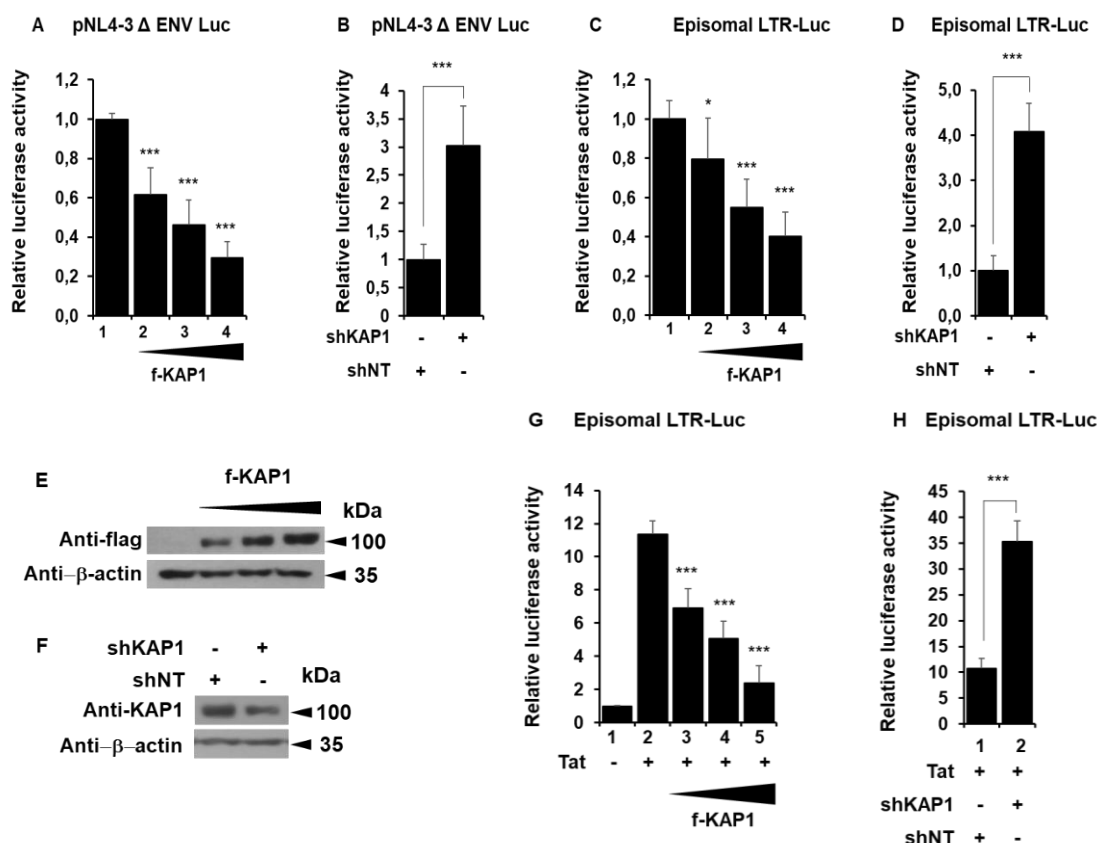


Figure 8 : KAP1 inhibe la phase précoce et tardive Tat dépendante de la transcription du VIH-1. (A, B) Les cellules microgliales ont été transfectées avec les vecteurs pNL4-3 Δ ENV Luc en présence d’une dose croissante de KAP1 (A), ou avec une déplétion de KAP1 (B). 48 heures post-transfection, les cellules ont été lysées et l’activité Luciférase a été mesurée de façon relative aux activités obtenues avec le pNL4-3 ΔENV Luc seul. (C, D, G, H) Les cellules microgliales ont été transfectées avec le vecteur épisomal LTR-Luc, en présence d’une dose croissante de KAP1 (C, G), ou en absence de KAP1 (ShKAP1) (D, H), en absence (C, D) ou en présence d’une quantité stable de Tat (G, H). L’activité Luciférase a été mesurée 48 heures post-transfection et après lyse des cellules. Les valeurs de Luciférase ont été normalisées à celles obtenues avec le LTR-Luc seul. Un t-test a été effectué sur 3 expériences indépendantes p (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (E, F) La surexpression en doses croissantes de KAP1, de même que l’efficacité de knock-down, ont été validées par Western blot.

9- La déplétion d’UBC9 active la transcription basale et Tat dépendante du VIH-1

UBC9 est décrite pour sa capacité d’interagir avec Gag afin de permettre l’assemblage et la production de particules virales infectieuses de VIH-1. L’extinction de l’expression d’UBC9 a induit la génération de virions défectueux (Bohl et al., 2013). Nous avons étudié les effets d’UBC9 sur l’activité transcriptionnelle du promoteur viral LTR du VIH-1 (**figure 9**). Nous n’observons aucun effet significatif d’une surexpression d’UBC9 sur l’activité basale du promoteur LTR du VIH-1 (**figure 9 A**). Cependant, la déplétion d’UBC9 augmente significativement la phase précoce de la transcription virale (**figure 9 B**). Nous avons démontré l’importance de la voie SUMO dans la dégradation de Tat. De ce fait, nous avons mesuré

l'activité transcriptionnelle de Tat, en présence et en absence d'UBC9, (**figures 9 C et D**). La surexpression d'UBC9 inhibe, significativement, la transactivation virale médiée par Tat, (**figure 9 C**). A l'opposé, la déplétion d'UBC9 renforce, très fortement, l'activité transcriptionnelle de Tat au promoteur viral (**figure 9 D**).

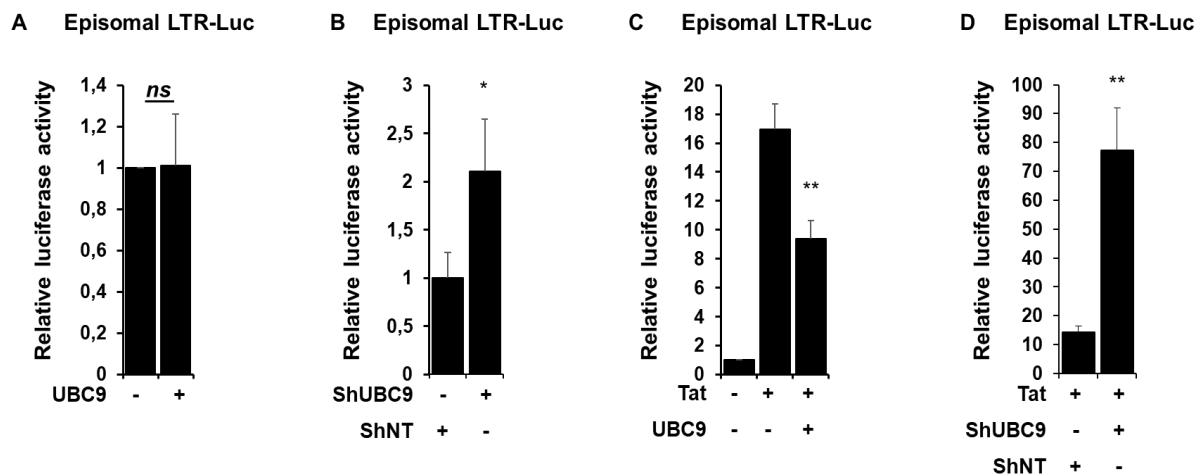


Figure 9 : La déplétion d'UBC9 active la transcription du VIH-1. (A, B, C, D) Les cellules microgliales ont été transfectées avec le vecteur épisomal LTR-Luc seul (A, B), ou avec Tat (C,D) en présence d'une surexpression (A, C), ou d'une déplétion (B, D) d'UBC9. 48 heures post-transfection, les cellules ont été lysées et l'activité Luciférase mesurée et normalisée à la condition contenant le LTR-Luc seul. Un t-test a été effectué sur 3 expériences indépendantes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

10- KAP1 et CTIP2 coopèrent pour réprimer la transcription du VIH-1

Etant donné que CTIP2 et KAP1 interagissent physiquement, nous avons mesuré l'expression virale en présence d'une surexpression de ces protéines seules ou en combinaison, (**figure 10 A**). Comme attendu, KAP1 et CTIP2 seuls inhibent l'expression virale mesurée après transfection de la construction virale pNL4-3 Δ ENV Luc, (**figure 10 A, colonnes 2 et 3**). De façon intéressante, l'expression concomitante de KAP1 et CTIP2 inhibe plus fortement l'expression du VIH-1, (**figure 10 A, colonne 4**). Logiquement, on observe cette même coopération dans le cas d'une déplétion simultanée des deux protéines, (**figure 10 B, colonne 4**). Il faut noter que les effets des ShKAP1 et ShCTIP2, pris individuellement, sont plus modestes que ceux observés précédemment. Ces observations s'expliquent par l'utilisation d'une concentration moindre des constructions imposées par le design expérimental. Des résultats similaires ont été obtenus par mesure de l'activité du gène rapporteur LTR-Luc, après surexpression ou knock-down simultané de KAP1 et CTIP2, (**figures 10 C et D**). Les contrôles de surexpression et de knock-down de KAP1 et CTIP2 ont été réalisés par western blot, (**figures 10 E et F**). De même, KAP1 et CTIP2 inhibent l'activité transcriptionnelle médiée par Tat, (**figure 10 G, colonnes 3 et 4**) et coopèrent dans cette répression, (**figure 10 G, colonne 5**). De

manière très intéressante, la déplétion simultanée de KAP1 et CTIP2 stimule plus fortement la transcription du VIH-1 médiée par Tat, (**figure 10 H, colonne 4**). Les contrôles de surexpression et de knock-down de KAP1, CTIP2 et Tat ont été réalisés par western blot, (**figures 10 I et J**). Ainsi, nous avons mis en évidence la présence d'un nouveau facteur répresseur de la transcription du VIH-1 qui est KAP1. De plus, nous montrons que KAP1 coopère avec CTIP2 pour réprimer l'expression virale.

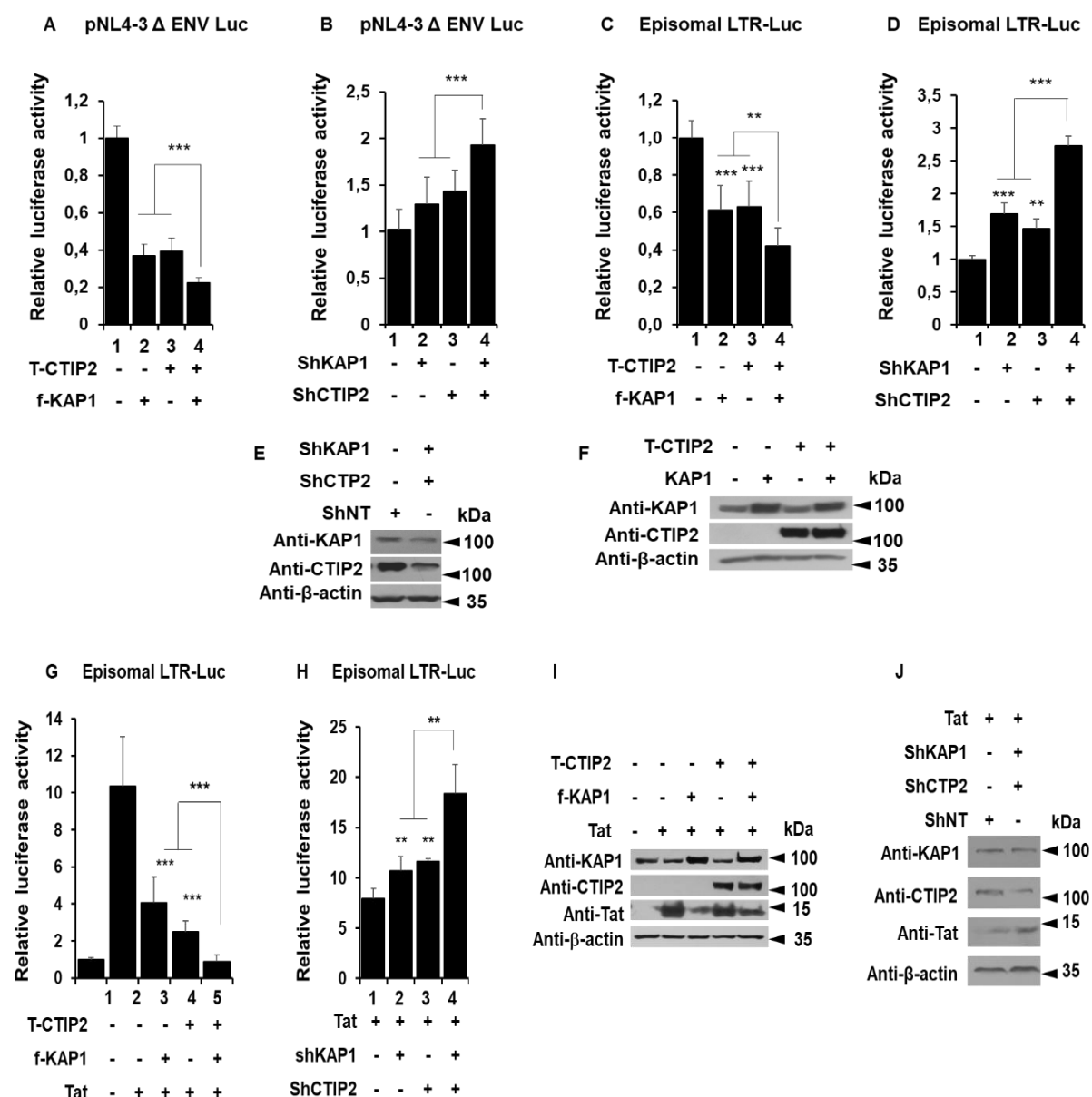


Figure 10 : KAP1 et CTIP2 coopèrent pour réprimer la transcription du VIH-1. (A, B, C, D, G, H) Les cellules microgliales ont été transfectées avec les vecteurs pNL4-3 Δ ENV Luc (A, B) ou LTR-Luc (C, D, G, H) dans les conditions indiquées. Les activités Luciférase ont été mesurées au bout de 48 heures de transfection, après lyse des cellules, et normalisées aux conditions où les vecteurs pNL4-3 Δ ENV Luc et LTR-Luc ont été transfectés seuls. Un t-test a été effectué sur 3 expériences indépendantes p (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (E, F, I, J) Les surexpressions et knock-down des protéines indiquées ont été validés par Western blot.

Matériel et méthode

1- Les plasmides

Les plasmides utilisés dans cette études : pcDNA3, flag CTIP2, flag-CTIP2 350-813, 350-717, 1-354 et 145-434, Tap-CTIP2, flag-Tat, ShCTIP2, LTR-Luc, pNL4-3 Δ ENV Luc ont été décrits et utilisés dans de précédents travaux (Cherrier et al., 2013; Marban et al., 2007; Rohr et al., 2003a). Ha-SUMO2, mCHERRY-Tat, Tat, flag-SENP1, UBC9 et ShUBC9 nous ont été fournis par le Dr Virginie Gautier (UCD). Les plasmides flag-KAP1, flag-KAP1 S824A/D proviennent du Dr David K. Ann (Li et al., 2007b). Les vecteurs ShKAP1 et ShNT (non target) nous ont été envoyés par le Dr Ivan D'orso (McNamara et al., 2016). Les plasmides flag-KAP1WT, flag-KAP1 Δ RBCC, Δ PHD, Δ Bromo, Δ PHD/ Δ Bromo nous ont été fournis par le Dr Florence Cammas (IRCM Montpellier). GFP-KAP1 provient de la société Addgene et GFP-UBC9 a été fourni par le Dr Frédérique Tesson (Université d'Ottawa).

2- Les lignées cellulaires

La lignée cellulaire microgliale humaine (fournie par le Pr M. Tardieu, Paris, France) (Janabi et al., 1995), et les lignées cellulaires HEK293T ont été maintenues dans un milieu DMEM contenant 10% sérum de veau foetal décomplémenté et 100 U/ml de pénicilline-streptomycine. Lorsque cela est indiqué, les cellules ont été traitées avec 50 μ M de MG132 pendant 6 heures. De même, lorsque c'est mentionné, les extraits de protéines nucléaires ont été traités avec 0,2 mM d'Iodoacétamide et 0,2 M de N-éthylmaléimide.

3- Anticorps et réactifs

La liste des anticorps et autres réactifs chimiques utilisés dans ce travail sont listés dans le tableau qui suit.

Réactifs	Référence et firme
CTIP2	A300-383A Bethyl
KAP1	Ab10483 Abcam
Tat	ab43014 Abcam
β -actine	A1978 SIGMA
Flag	F3165 SIGMA
GFP	632592 Clontech
α -tubulin	Ab4074 Abcam
UBC9	610749 BD Biosciences

Ha	901 501 Biolegend
MG132	BML-PI102-0025 ENZO Life Sciences
Iodoacétamide	I1149 SIGMA
N-éthylmaléimide	E3876 SIGMA
Anticorps anti-souris	Sc-358914 Santa Cruz
Anticorps anti-lapin	Sc-2004 Santa Cruz
Anti-protéases	000000011873580001 SIGMA
Reverse PCR	1708890 Bio Rad
PCR quantitative	Ssoadvanced™ Universal SYBR Green Supermix Bio Rad
IgG de lapin	C15410206 Diagenode
IgG souris	C15400001-15 Diagenode
Billes d'immunoprécipitation anti-flag	A-2220 SIGMA
Billes magnétiques de protéine G	C03010021-220 Diagenode
Billes magnétiques de protéine A	C03010020-220 Diagenode
ALEXA Fluor Goat anti-mouse	A-21237 Invitrogen

4- Extraction protéique

4.1- Extraction des protéines nucléaires

Les cellulesensemencées à une densité de 3×10^6 million et cultivées en boîte de 10 cm ont été transfectées avec les vecteurs indiqués (30 μ g) en utilisant le procédé de co-précipitation au chlorure de calcium. Au bout de 48 heures de transfection, les cellules sont lysées pendant 10 minutes sur glace dans un tampon contenant : 10 mM HEPES, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0,5 mM de DTT. Après centrifugation d'une minute à 13000 g, le culot nucléaire est lysé pendant 30 minutes sur glace dans un autre tampon contenant : 20 mM HEPES, 25% glycérol, 1,5 mM $MgCl_2$, 420 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT. Après centrifugation de 2 minutes à 13000 g, le surnageant est conservé pour être analysé par immunoprécipitation et Western blot. Les anti-protéases sont systématiquement ajoutées aux tampons de lyses. Les inhibiteurs de SUMO protéases sont additionnés quand cela est indiqué.

4.2- Extraction des protéines totales

Les cellulesensemencées à une densité de 1×10^6 million et cultivées en boîte de 6 puits ont été transfectées en utilisant le procédé de co-précipitation au chlorure de calcium avec les vecteurs indiqués (12 μ g). Au bout de 24 heures, les cellules sont lysées sur glaces pendant 50 minutes à l'aide d'un tampon contenant : 10 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1%

NP40, 0,5% Na désoxycholate, 0,1% SDS. Après centrifugation de 10 minutes à 13000 g, le surnageant est conservé pour être analysé par Western blot. Les anti-protéases ont été systématiquement ajoutés aux tampons de lyses.

5- Les essais de co-immunoprécipitation et Western blot

Les immunoprécipitations ont été réalisées sur 500 µg d'extraits de protéines nucléaires par utilisation du gel M2 anti-flag de SIGMA ou par utilisation des billes magnétiques couplées aux protéines A/G de Diagenode pour cibler les protéines endogènes. Les complexes protéiques immunoprécipités ont été soumis à des analyses standards de Western blot. Les protéines ont été détectées par utilisation des anticorps comme indiqué et visualisées par un système de détection par chimioluminescence de Thermo Scientific (Pierce™ ECL Western blotting Substrate 32106).

6- La spectrométrie de masse

Les cellules HEK ont été transfectées avec le vecteur flag-CTIP2. Les protéines nucléaires ont été extraites et soumises à une immunoprécipitation anti-flag. Les protéines immunoprécipitées ont été éluées, puis digérées comme décrit dans cette précédente étude (Turriziani et al., 2014). Les peptides ont été séparés et analysés par chromatographie liquide en phase inverse couplée à un spectromètre de masse à haute résolution (Q-Exactive connecté à un système de chromatographie Ultimate Ultra3000 (Thermo Scientific, Allemagne)). Les spectres de masse ont été analysés à l'aide du logiciel MaxQuant. Les résultats sont représentatifs de trois duplicatas expérimentaux indépendants. Les résultats ont été obtenus sous forme d'intensités protéiques calculées en résumant les intensités ioniques des peptides correspondant de façon unique à la séquence protéique identifiée dans tous les échantillons (Turriziani et al., 2014). Les protéines en interaction avec CTIP2 ont été déterminées après normalisation à la trypsine utilisée pour la digestion peptidique. Une normalisation par rapport à une condition contrôle représenté par des cellules transfectées avec le vecteur vide pcDNA3 a, également, été réalisée.

7- La microscopie confocale et l'immunofluorescence

Les cellules microgliales cultivées en boîte de 24 puits à fond transparent (Greiner bio-one 662892) ont été transfectées avec les vecteurs indiqués par la méthode de Jetprime (polyplus transfection), selon les instructions du fournisseur. Au bout de 24 heures de transfection, les cellules ont été fixées avec du PFA à 4% et perméabilisées au PFA 4%-triton 1%. La fluorescence a été observée au microscope confocal à l'aide du Leica SPE équipé d'un objectif

d'immersion dans l'huile Leica 63x 1,4NA (HXC PL APO 63x/1,40 OIL CS). L'immunodétection a été réalisée comme précédemment décrit (Fritz et al., 2008). Après fixation et perméabilisation, les cellules ont été incubées dans un tampon de blocage à la BSA suivie d'une incubation avec l'anti-flag qui a été utilisé comme anticorps primaire et l'ALEXA Fluor goat anti-mouse a été utilisé comme anticorps secondaire. Les cellules ont ensuite été analysées au microscope confocal.

8- Les essais Luciférase

Les cellules microgliales cultivées en boîte de 48 puits, ont été transfectées en triplicata, par la méthode de co-précipitation au chlorure de calcium, avec les vecteurs indiqués en présence du CMV-Renilla Luciférase. 48 heures post transfection, les cellules ont été collectées et l'activité de la Luciférase de Luciole a été mesurée à l'aide du système Dual-Glo Luciférase Assay (Promega Madison, USA) et normalisée à l'activité de la Luciférase de Renilla. Les valeurs correspondent aux moyennes d'au moins 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

9- La quantification des mRNA

Les RNA totaux ont été extraits selon le protocole du kit RNeasy Plus de QIAGEN, à partir des cellules HEK transfectées avec les vecteurs indiqués. Les cDNA ont été produits à partir des RNA extraits à l'aide du kit de transcription inverse de Bio Rad (iScriptTM Reverse Transcription Supermix). Les cDNA ont été quantifiés par PCR quantitative en utilisant le Ssoadvanced Universal SYBR Green Supermix de Bio Rad. Ces cDNA ont été utilisés pour l'amplification par PCR quantitative du gène *tat* en utilisant ces primer sens : 5' ACTCGACAGAGGAGAGCAAG 3' et anti sens : 5' GAGATCTGACTGTTCTGATGA 3'. La GAPDH, dont le primer sens est : 5' GGACCTGACCTGCCGTCTAGAA 3' et le primer anti-sens est : 5' GGGTGTCTGCTGTTGAAGTCAGAG 3', a été utilisée comme contrôle.

Les données ont été calculées en utilisant la méthode de $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ et normalisées à la quantité de GAPDH.

10- Analyse statistique

Les données ont été analysées en réalisant un t-test à l'aide de Microsoft Excel. Des valeurs de $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ ont été considérées comme significatives. Les résultats ont été représentés sous forme de moyennes et d'écart-type d'au minimum 3 expériences indépendantes.

Discussion et perspectives

La thérapie antirétrovirale a, considérablement, amélioré la prise en charge de l'infection par le VIH-1 et en a, particulièrement, amélioré la survie. Malgré l'administration de la HAART, il est toujours impossible d'éliminer le VIH des patients chez qui le virus intégré latent persiste. De plus, cette virémie rebondit à l'arrêt de la thérapie. Le rebond se produit à partir de réservoirs cellulaires de virus latents qui s'établissent aux étapes précoces de l'infection. Parmi les principaux réservoirs, sont retrouvés les cellules T CD4+ quiescentes et les cellules de la lignée monocyte-macrophage, y compris les cellules microgliales, qui sont les macrophages résidents du système nerveux central. Ces réservoirs latents persistent dans ces cellules à longue durée de vie, qui hébergent le DNA intégré du VIH-1, mais qui reste transcriptionnellement silencieux, échappe à la surveillance immunitaire et ne peut pas être ciblé par les thérapies actuelles. La transcription du VIH-1 est, souvent, rendue silencieuse par des modifications épigénétiques survenant dans ces réservoirs. Ces changements épigénétiques restent un obstacle majeur à l'éradication et à la guérison des patients. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement et le maintien de la latence du VIH-1 est d'une importance primordiale pour l'élimination de ces réservoirs latents. Des progrès significatifs ont été réalisés dans le développement de diverses thérapies qui peuvent cibler le VIH et prévenir la progression de la maladie tels que les agents d'inversion de la latence ou LRAs, pour lesquels on prête une grande attention. La synergie pharmacologique des LRAs a été explorée par plusieurs groupes de chercheurs, qui ont montré que l'activité d'une combinaison de LRA est supérieure à la somme de chaque LRA utilisé individuellement (Darcis et al., 2015; Martínez-Bonet et al., 2015b).

Nous avons, précédemment, démontré que le facteur CTIP2 est un acteur majeur dans l'établissement et la persistance de la latence du VIH-1 dans les cellules microgliales. Il contribue de manière synergique avec LSD1 à la formation de structure hétérochromatinienne au promoteur viral. Ces deux protéines servent de plateforme d'ancrage à des complexes contenant HDAC1/2, SUV39h1, hCOMPASS, afin d'induire, respectivement, des marques épigénétiques de déacétylation, H3K9me3 et H3K4me3 au promoteur viral (Le Douce et al., 2012; Marban et al., 2007). CTIP2 est capable d'inhiber le facteur cellulaire d'élongation P-TEFb indispensable à la transcription et à la réactivation des virus latents (Cherrier et al., 2013). Nos résultats indiquent, également, que CTIP2 est capable d'inhiber la transcription virale dépendante de Tat et coopèrent avec LSD1 et HMGA1 dans cette répression (Eilebrecht et al., 2014; Le Douce et al., 2012). Ces résultats montrent le rôle pléiotropique de CTIP2 dans le

contrôle de la transcription virale. De plus, de nombreuses stratégies de LRAs ciblant les facteurs associés à CTIP2 ont déjà démontré leur efficacité dans les essais de réactivation (pour revue (Spivak and Planelles, 2018)). Nos travaux nous ont permis d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires de CTIP2, qui seraient impliqués dans la régulation de la transcription virale et l'établissement de la latence.

1- Les principaux complexes associés à CTIP2 et leur implication dans la transcription du VIH-1

Par des expériences d'immunoprécipitations de CTIP2, suivies d'une spectrométrie de masse, nous avons identifié différents complexes protéiques. Parmi les ontologies fonctionnelles de ces facteurs nous retrouvons la division cellulaire, l'adhésion cellule-cellule, la réparation, la réplication et la transcription du DNA, l'activité hélicase, la déacétylation d'histones, l'épissage des mRNA, la liaison aux nucléotides et la prise en charge des RNA ribosomiaux.

1.1- Les protéines de réponse aux dommages de DNA

Nous avons identifié des protéines impliquées dans les réponses aux dommages de DNA telles que PARP1 (Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1), Top2 β (DNA Topoisomerase 2 Beta), XRCC6 (X-Ray Repair Cross Complementing 6) et PRKDC (Protein Kinase DNA-activated Catalytic polypeptide). Le rôle de CTIP2 dans les mécanismes de dommages et réparation du DNA ne sont pas clairement établis. Des mutations et des délétions de CTIP2 ont été identifiées dans les leucémies aiguës lymphoblastiques. A l'aide d'un modèle murin de lymphomes thymiques, il est démontré que les souris CTIP2 KO/+ et p53 KO/+ doubles hétérozygotes, mais pas les souris hétérozygotes CTIP2 KO/+, développent spontanément des lymphomes thymiques, suggérant la coopérativité de CTIP2 et p53 dans le développement du cancer (KOMINAMI, 2012). Il a été démontré que CTIP2 se lie et inhibe de manière dépendante à p53 le promoteur du gène *hdm2*, une ubiquitine ligase, qui conduit à la dégradation de p53. Cette inhibition de l'expression d'HDM2 par CTIP2 est moins efficace après des dommages de DNA causés par des irradiations (Obata et al., 2012).

Actuellement, on porte un grand intérêt à l'implication de la Top2 β : une enzyme qui contrôle la structure topologique du DNA en y générant des coupures transitoires ainsi que les protéines de réparations du DNA (PRKDC, XRCC5/6 et PARP1) dans la régulation transcriptionnelle du VIH-1. En effet, l'implication de Top2 β au cours de l'infection par le VIH-1 a été démontré par une diminution de la charge virale lors de la déplétion de cette enzyme (Bouillé et al., 1999). La Top2 β s'est avérée associée à des événements de transfert de brin lors la transcription inverse

du virus (Lokeswara Balakrishna et al., 2013). Des sites de liaison et de clivage par la Top2 β ont été identifiés à environ 850 pb, en amont du site d'intégration du VIH-1 dans le génome hôte et dans le LTR5', en particulier sur la région TAR, qui évoquerait un possible rôle de la Top2 β dans la transcription (Pommier et al., 1994). Dans une étude plus récente, il a été démontré que la surexpression de la Top2 β contribue à augmenter la production virale (Chekuri et al., 2016). De plus, Tat est capable d'interagir avec Top2 β , XRCC6 et PARP-1. Ces interactions de Tat ont été affectées par des déplétions ou des traitements inhibiteurs de la Top2 β , soulignant l'importance des cassures double brin générées par Top2 β dans son interaction avec Tat, XRCC6 et PARP-1. Au total, ces résultats suggèrent que Top2 β se lie au promoteur du VIH-1 conjointement avec Tat, XRCC6 et PARP-1, et que son activité catalytique est essentielle au déclenchement de la transactivation virale (Chekuri et al., 2016). D'autres travaux ont indiqué que XRCC5/6 jouent un double rôle dans la réponse à l'infection par le VIH-1, en favorisant la transcription précoce du promoteur viral et en limitant l'établissement de la latence virale. A l'inverse, la déplétion de XRCC5 limite l'expression du VIH-1 et favorise l'établissement de la latence. En effet, l'absence d'XRCC5 augmente le taux de réactivation du VIH-1, induite par le TNF α ou la TSA, et pourrait constituer une cible intéressante dans les stratégies LRAs (Manic et al., 2013).

Enfin, l'induction de dommages au DNA par l'inhibiteur de la Top2 β , l'étoposide, entraîne un puissant blocage de l'infection par le VIH-1 dans les macrophages dérivés des monocytes humains. Il est rapporté que SAMHD1 a été activée par déphosphorylation à la suite du traitement par l'étoposide. Il est à préciser que la suppression de l'infection s'est produite à l'étape post-RT, après l'achèvement de la synthèse du DNA viral, à l'étape de la formation des cercles à 2 LTRs et du provirus. Ce blocage induit par l'étoposide a, complètement, été évité par la déplétion de SAMHD1. Ainsi, les auteurs suggèrent que l'inhibiteur de la Top2 β , l'étoposide, révèle un mécanisme par lequel le réservoir du VIH-1 peut être limité par une nouvelle classe de médicaments chimiothérapeutiques (Mlcochova et al., 2018).

Etant donné que CTIP2 interagit avec ces protéines des complexes de dommages de DNA, il serait intéressant d'étudier le lien fonctionnel qui existe entre ces différentes composantes, et qui interviendrait au niveau de la régulation transcriptionnelle du provirus.

1.2- Les protéines de remodelage de la chromatine

Parmi les partenaires protéiques de CTIP2, nous retrouvons des protéines impliquées dans les remodelages de la chromatine, tels que : les membres du complexe NuRD : CHD3 et 4 (Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 3/4), HDAC1/2, MBD3 (Methyl-CpG Binding

Domain Protein 3), MTA2 (Metastasis-Associated Protein 2), RBBP4 et 7 (RB Binding Protein 4/7, chromatin remodeling factor). Des protéines membres du complexe SWI/SNF telles que : SMARCA4 (SWI/SNF-related Matrix-associated Actin-dependent Regulator of Chromatin subfamily A member 4) également nommé BRG1 (Brahma-Related Gene-1), SMARCA5 nommé aussi SNF2h (Sucrose Nonfermenting protein 2 homolog), et le répresseur transcriptionnel des hormones thyroïdiennes NCOR1 (Nuclear receptor corepressor 1) ont, également, été retrouvés.

Les effets répresseurs de CTIP2 sur la transcription du VIH-1 par induction d'hétérochromatine au promoteur viral, par interaction avec le complexe NurD ou ses différentes sous-unités, ont été, déjà, démontrés (Cismasiu et al., 2008; Marban et al., 2007).

Chez les mammifères, les complexes SWI/SNF sont des assemblages d'au moins 13 sous-unités, générant une grande diversité de complexes. Des analyses de spectrométrie de masse des complexes SWI/SNF, purifiés à l'aide de l'anticorps BRG1, ont permis d'identifier CTIP2 comme nouveau membre du complexe SWI/SNF (Kadoch et al., 2013). Au moins deux complexes SWI/SNF, biochimiquement distincts, appelés BAF et PBAF, qui effectuent des fonctions distinctes dans la régulation de la transcription, ont été décrits (Nagl et al., 2007). Sur le LTR du VIH, un remodelage actif de la chromatine est nécessaire pour la génération d'une conformation répressive à la transcription. Ainsi, en l'absence de Tat, BAF est lié au promoteur du VIH, où il réprime la transcription en positionnant nuc-1 dans une position, énergétiquement, moins favorable à la transcription, immédiatement en aval du TSS (Mizutani et al., 2009; Rafati et al., 2011). Un isoforme court de BRD4 (BRD4s) ne possédant plus l'extrémité N-terminale d'interaction avec P-TEFb lie, directement, la sous-unité catalytique de BAF, BRG1. Ainsi, BRD4S serait nécessaire au recrutement de BRG1, afin de maintenir une structure nucléosomique répressive au niveau du promoteur latent du VIH-1 (Conrad et al., 2017). Lors de l'activation des lymphocytes T CD4+, BAF se dissocie du LTR, ce qui entraîne le repositionnement des nucléosomes à des positions conduisant à la dérégulation de la transcription du VIH. A l'expression de Tat, celui-ci va être acétylé par p300 et recruter le complexe PBAF, qui utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour repositionner activement les nucléosomes formés en aval du TSS, afin de permettre une élongation efficace de la transcription (Mizutani et al., 2009; Rafati et al., 2011). Il serait intéressant d'étudier dans quelle mesure CTIP2 pourrait influencer le recrutement ou le déplacement de ces complexes BAF et PBAF au promoteur viral.

Le répresseur transcriptionnel NCOR1 avec HDAC3, qui en constitue le core enzymatique, interagit avec la protéine virale répressive E8^{E2} pour inhiber la réplication du génome du

papillomavirus dans des cellules indifférenciées, mais aussi la réplication productive dans l'épithélium différencié (Dreer et al., 2017). Pour le VIH-1, il a été démontré que le facteur négatif d'élongation de la transcription NELF interagit avec NCOR1/HDAC3, et s'associe au LTR latent. Cette étude suggère que NELF recrute NCoR1/HDAC3 sur la RNA Pol II en pause, renforçant la répression de la transcription du VIH-1 et favorisant l'établissement de la latence virale (Natarajan et al., 2013). Ainsi, de futures études permettront de connaître la possible implication de CTIP2 dans le recrutement du complexe NCOR1,

1.3- Les protéines de la voie SUMO

Des protéines de la voie SUMO ont, également, été retrouvées parmi les partenaires cellulaires de CTIP2. On dénombre les enzymes E3 de conjugaison de SUMO : TRIM28/KAP1, NSMCE2 (Non-Structural Maintenance Of Chromosomes Element 2), RanBP2 (Ran Binding Protein 2) et les SUMO protéases SENP1 et 3.

Actuellement, 3 principales études ont montré que CTIP2 pouvait être modifiée par sumoylation (Dubuissez et al., 2016; Tirard et al., 2012; Zhang et al., 2012). En effet, l'activité répressive de CTIP2 est modifiée par sumoylation. Dans les lymphocytes T CD4+, CTIP2 exerce une activité répressive de la transcription de l'IL2 par interaction avec NuRD. L'activation de la voie PKC induit la phosphorylation de CTIP2 avec une dissociation de NuRD. La sumoylation de CTIP2 par SUMO1 ou SUMO2/3 conduit au recrutement de p300 pour activer la transcription. A partir de cette étape, les avis divergent quant au devenir de CTIP2. Initialement, il avait été suggéré que CTIP2 serait désumoylée par SENP1, puis ubiquitinylée et orientée vers une dégradation par la voie du protéasome (Zhang et al., 2012). Plus récemment, une régulation transcriptionnelle de CTIP2 par le facteur de transcription KLF4 est proposée pour limiter l'activation du promoteur de l'IL2 (Dubuissez et al., 2016).

Globalement, la sumoylation est décrite pour avoir un effet répresseur sur la transcription. Dans le cas du VIH-1, quelques travaux se sont intéressés à l'étude de l'importance de la voie SUMO dans la réplication du virus. BCA2 (Breast Cancer-Associated gene 2, connue aussi sous le nom de Rabring7, RNF115, ou ZNF364) est un cofacteur du facteur de restriction BST2, qui agit au cours de l'étape tardive de bourgeonnement du VIH-1, en inhibant la libération des particules virales. BCA2 est induite par NF- κ B en raison de la présence d'éléments de liaison à NF- κ B dans son promoteur. Cette régulation positive de BCA2 fournit un rétrocontrôle négatif sur NF- κ B. Plus précisément, BCA2 sert de SUMO E3 ligase dans la sumoylation d'I κ B α , qui à son tour renforce la séquestration de NF- κ B dans le cytoplasme. Comme le VIH-1 utilise NF- κ B pour sa transcription provirale, son inhibition par BCA2 a pour effet direct une diminution

significative de l'activité transcriptionnelle du provirus (Colomer-Lluch and Serra-Moreno, 2017).

La protéine TRIM5 α , connue pour son activité de restriction du VIH-1, repose sur sa capacité à reconnaître le core viral de la CA, peu après l'entrée du virus dans la cellule. L'interaction entre TRIM5 α et la capsid conduit à la déstabilisation du réseau de la CA, avec, pour conséquence, un désassemblage de cette dernière et une dégradation de ses composants (Kutluay et al., 2013; Stremlau et al., 2006). Trim5 α a été, également, décrite pour entraver le transport viral vers le noyau (Campbell et al., 2008). Récemment, un motif nommé SIM4, a été identifié au sein de TRIM5 α . Il est démontré que la mutation de ce domaine entraîne une perte d'interactions avec la capsid et la restriction du VIH-1 (Nepveu-Traversy et al., 2016). TRIM5 α favorise l'activation des voies de signalisation immunitaires, en activant les facteurs de transcription AP1 et NF- κ B, et aboutit à la production de diverses cytokines et chimiokines inflammatoires. La mutation du motif SIM4 de TRIM5 α a perdu la capacité à activer la transcription médiée par NF- κ B et AP1. Bien qu'il n'y ait aucune preuve que SIM4 de TRIM5 α soit impliqué dans une interaction directe avec SUMO ou une protéine sumoylée, la mutation de ce motif a, fortement, réduit la colocalisation de TRIM5 α avec SUMO-1 et PML (Nepveu-Traversy et al., 2016).

Il a déjà été rapporté qu'UBC9 interagit avec Gag, et joue un rôle important dans la voie d'assemblage du VIH-1 et la production de particules virales infectieuses (Jaber et al., 2009). L'assemblage des particules virale médié par Gag, de même que le clivage par la protéase de Gag et Gag-Pol, sont inchangés en l'absence d'UBC9. Cependant, la stabilité des glycoprotéines d'enveloppe associées aux membranes cellulaires est diminuées et leur incorporation dans les virions libérés modifiée (Jaber et al., 2009). Il est indiqué que l'activité enzymatique d'UBC9 n'a pas de rôle dans la réduction des niveaux d'Env intracellulaires (Jaber et al., 2009). Il s'agirait d'une dégradation d'Env par les voies lysosomales qui survient avant son trafic vers la membrane plasmique (Bohl et al., 2013).

La protéine p6, issue du clivage de la polyprotéine Gag et impliquée dans le bourgeonnement du virus, est décrite pour interagir avec SUMO1, UBC9 et pour être sumoylée. Il est démontré que SUMO-1 est incorporé dans la membrane du virion du VIH-1. Cette incorporation de SUMO-1 dans le virus n'affecte pas le relargage des particules virales, ni leur contenu en protéines ou en RNA. Cependant, l'infectivité de ces virions est réduite, en raison d'un défaut survenant après la fusion membranaire, au moment de la synthèse virale du cDNA. L'effet répresseur de SUMO-1 sur la réplication virale étant dépendant de la présence de la lysine K27 sumoylable sur p6 (Gurer et al., 2005).

Il est démontré que l'intégrase peut interagir avec SUMO1/2 et UBC9 et être modifiée par sumoylation. La surexpression d'UBC9, SUMO1/2, ou leur déplétion, induit, respectivement, une inhibition ou une augmentation des niveaux d'intégration virale (Li et al., 2012b). Globalement, les voies de sumoylation semblent agir comme des facteurs de restriction cellulaires capables de nuire à l'infection par le VIH-1.

Le rôle des complexes polycombes dans l'établissement de la latence du VIH-1 est connu par l'induction des marques de mono, di et tri-méthylation de H3K27. CBX4 fait partie du complexe Polycomb PCR1 qui n'agit pas, uniquement, comme un répresseur transcriptionnel, impliqué dans le remodelage de la chromatine et la modification des histones (Gil and O'Loghlen, 2014). CBX4 induit la sumoylation de protéines, grâce à sa fonction de SUMO E3 ligase, telles que : la DNA méthyl-transférase DNMT3a, ce qui affecte sa fonction de répresseur, la protéine BMI1 du complexe PC1, impliquée dans les réponses aux dommages au DNA et le répresseur transcriptionnel CTCF, ce qui contribue à ses fonctions répressives (Ismail et al., 2012; Li et al., 2007a; MacPherson et al., 2009). Dans le cas du VIH-1, l'activation cellulaire au PMA a entraîné la dégradation par le protéasome de BMI1 qui est sumoylée par CBX4. De même, la déplétion de BMI1 s'est montrée efficace pour réactiver le virus à partir d'un modèle cellulaire T CD4+ de latence virale (Yoon et al., 2014).

La nucléopore RanBP2 interagit avec la capsidie pour ancrer le virion aux complexes des pores nucléaires et permettre la progression vers la phase d'intégration. Cependant, aucun rôle direct des domaines SUMO E3 ligase de RanBP2 n'a été révélé dans l'engagement de la capsidie du VIH-1 et la translocation nucléaire suivie de l'intégration du provirus (Meehan et al., 2014). La SUMO E3 ligase NSMCE2 possède plusieurs activités requises à la réparation du DNA, au maintien de la longueur des télomères, à l'intégrité nucléaire et chromosomique et dans la progression du cycle cellulaire dont l'activité de SUMO ligase est nécessaire (Ni et al., 2012). Avec tous ces effets, il est possible que cette protéine puisse jouer un rôle dans la régulation du cycle de réplication virale. Cependant, aucune étude n'a rapporté les effets de NSMCE2 sur l'activité transcriptionnelle du promoteur du VIH-1.

L'activité de l'intégrase du VIH-1 est régulée positivement par acétylation, grâce à p300. KAP1 est capable de restreindre l'infection virale par liaison à l'intégrase du VIH-1 et induction de sa déacétylation par formation d'un complexe avec HDAC1 (Allouch et al., 2011). Bien que deux études aient montré que les protéines à domaine KRAB-ZNF : ZBRK1 et ZNF10, précédemment décrites pour leur capacité à recruter KAP1 au niveau génique, régulent négativement la transcription du VIH-1 (Nishitsuji et al., 2012, 2015), aucun effet direct de KAP1 sur l'activité du promoteur viral n'a été rapporté.

Parmi tous ces nouveaux partenaires cellulaires de CTIP2 identifiés, il est possible que certains puissent contribuer à réguler le cycle de réplication du VIH-1 à différents niveaux. Cependant, il n'est pas à exclure qu'une partie non négligeable de ces facteurs puisse agir avec CTIP2 dans la pathogenèse d'autres maladies telles que le cancer.

2- KAP1, un nouveau partenaire de CTIP2

Comme CTIP2, KAP1 est décrit comme un répresseur transcriptionnel. Les similarités entre CTIP2 et KAP1 résident dans leur capacité à inhiber les gènes par interaction avec le complexe NuRD (Cismasiu et al., 2008; Schultz et al., 2001b) et dans leur répression de l'expression de p21 (Cherrier et al., 2009; Lee et al., 2007b). CTIP2 et KAP1 peuvent interagir avec les enzymes de réparation du DNA PARP1 et PRKDC (Quénet et al., 2008; Tomimatsu et al., 2009).

Nous avons trouvé que CTIP2 et KAP1 interagissent, respectivement, par leur domaine central (acides aminés 145-435) et le domaine RBCC. Comme CTIP2 et KAP1 ont, précédemment, été retrouvés associés au complexe cellulaire 7Sk snRNP (Cherrier et al., 2013; McNamara et al., 2016), nous avons observé par immunoprécipitation, en présence ou non de RNase, si cette interaction était dépendante des RNA cellulaires comme le 7SK. Nous avons trouvé que cette interaction était indépendante des RNA cellulaires.

KAP1 possède une localisation nucléaire grâce à la présence d'une séquence NLS entre les acides aminés 462-494, qui chevauche avec les sites de liaison à HP1 (Moriyama et al., 2015). Les études d'immunofluorescence montrent qu'il présente une distribution principalement nucléoplasmique. Une faible proportion de KAP1 est localisée dans des régions d'hétérochromatine péricentrique, et un pourcentage encore plus faible est retrouvé au niveau des nucléoles et de l'hétérochromatine (Ryan et al., 1999).

Les expériences d'immunofluorescence et de microscopie confocale ont, également, révélées que CTIP2 présente une localisation nucléaire sous forme de structures nommées « ball-like structure ». CTIP2 est présente à la périphérie, mais, également, à l'intérieur de ces structures (Marban et al., 2005; Rohr et al., 2003b).

Dans nos expériences d'immunofluorescence, nous montrons que KAP1 présente, principalement, une localisation nucléaire, comme décrit précédemment. Nous observons que CTIP2 est localisée dans des structures nucléaires denses. Ainsi, nous retrouvons une colocalisation de CTIP2 et KAP1 à la périphérie de ces structures nucléaires denses.

3- KAP1 comme CTIP2 interagit et colocalise avec le transactivateur du VIH-1 Tat

CTIP2 est, fortement, impliquée dans la latence du VIH-1. En effet, elle a été retrouvée, fortement, augmentée dans le SNC de patients présentant une latence virale (Desplats et al., 2013). Elle a la capacité d'inhiber la transcription virale dépendante de Tat par une relocalisation de cette dernière dans des structures nucléaires denses (Rohr et al., 2003b). De plus, une coopération avec les facteurs LSD1 et HMGA1 a été observée avec CTIP2 pour la répression de l'activité de Tat (Eilebrecht et al., 2014; Le Douce et al., 2012).

Par des expériences de co-immunoprécipitation, nous montrons que KAP1 interagit avec Tat. Par microscopie, Tat est présente à la fois dans le nucléoplasme et dans les nucléoles. Nos résultats montrent que Tat et KAP1 sont colocalisés dans le nucléoplasme. Lorsque CTIP2 est surexprimées en présence de Tat, nous observons une colocalisation de Tat avec CTIP2 dans des structures nucléaires denses. Cependant, lorsque les 3 protéines KAP1, Tat et CTIP2 sont coexprimées, nous constatons une redistribution plus importante de Tat au nucléoplasme. Il en est de même pour la colocalisation de CTIP2 avec KAP1 qui se trouve défavorisée. Nos résultats ont été confortés par des expériences d'immunoprécipitation en présence d'une dose croissante de Tat, où nous montrons que l'interaction de CTIP2/KAP1 diminue en faveur d'une interaction KAP1/Tat.

Ces observations suggèrent que Tat lierait le domaine RBCC de KAP1, qui constitue le même site par lequel CTIP2 lie KAP1. Ainsi, il existerait une compétition entre CTIP2 et Tat pour la liaison à KAP1. Une détermination par co-immunoprécipitation du domaine d'interaction de KAP1 avec Tat permettrait de savoir si le domaine RBCC de KAP1 est à l'origine de cette compétition entre CTIP2 et Tat. Ces résultats pourraient suggérer qu'en l'absence d'infection, CTIP2 et KAP1 pourraient colocaliser. En revanche, la présence d'une infection virale productive avec de forts niveaux de production de Tat serait plus favorable à une association de KAP1 avec Tat. Ainsi, il existerait une dynamique de formation des complexes KAP1/CTIP2 et KAP1/Tat, qui dépendrait de la présence d'une infection virale productive.

4- KAP1 conduit à la dégradation de Tat par le protéasome

KAP1 est capable d'induire la dégradation protéasomale de plusieurs protéines. Le suppresseur de tumeur p53, le régulateur de l'énergie cellulaire AMPK (Adenosine Monophosphate (AMP)-activated Protein Kinase), l'enzyme régulatrice de la glycogénèse FBP1 (Fructose-1,6-Biphosphatase) sont ubiquitinés grâce à l'activité E3 ubiquitine ligase du domaine RBCC de

KAP1. Ces protéines sont, ainsi, dégradées par le protéasome avec pour résultat (Jin et al., 2017; Okamoto et al., 2006; Pineda et al., 2015) :

- La suppression de l'apoptose médiée par p53 et la promotion de la survie des cellules tumorales.
- L'amplification de la signalisation de la voie mTORC (mammalian Target Of Rapamycin Complex) et une régulation négative de l'autophagie.
- L'augmentation de consommation de glucose et de lactate et la progression des hépatocarcinomes cellulaires.

Il a, précédemment, été décrit que la protéine virale Tat pouvait être dégradée par le protéasome. Nous avons observé dans quelles mesures KAP1 pouvait influencer l'expression et l'état de stabilité de Tat. Ainsi, la surexpression et la déplétion de KAP1 ont entraîné, respectivement, une diminution ou au contraire une augmentation de l'expression de Tat. Nous avons découvert que ces modulations de l'expression de Tat n'intervenaient pas au niveau transcriptionnel mais sont liées à une dégradation par le protéasome.

4.1- Modifications post-traductionnelles de Tat

Tat subit de multiples modifications post-traductionnelles régulant la transactivation induite par le LTR du VIH-1. Au début du cycle d'activation transcriptionnelle, Tat est inactivée par méthylation de ses arginines 52 et 53 par PRMT6, par méthylation des lysines 50 et 51 par SETDB1 et par déacétylation de la lysine 28 par HDAC6. Durant les premières phases d'activation de la transcription du VIH-1, Tat recrute PCAF afin d'être acétylée sur la lysine 28. Cette modification favorise l'affinité de Tat pour P-TEFb et TAR afin d'augmenter la processivité de la RNA Pol II. La lysine 51 de Tat est, ensuite, déméthylée par LSD1. Tat devient acétylée sur les lysines 50 et 51 par p300, qui entraîne sa dissociation de la TAR. Il est à noter que l'acétylation de Tat permet au complexe SWI/SNF de déplacer le nucléosome, afin de permettre l'élongation de la transcription. Durant la phase tardive d'élongation de la transcription, les marques d'acétylations de Tat sont retirées par SIRT1, pour permettre le recyclage de Tat (pour revue (Ott et al., 2011)). Il est mentionné que l'ubiquitination de la lysine 71 de Tat par HDM2 augmente l'activité de Tat sans moduler sa stabilité (Brès et al., 2003).

Trois isoformes de Tat sont, actuellement, décrits. La forme complète de 101 résidus est codée par le gène *tat* du VIH-1, elle est composée des deux exons. Le premier exon peut coder pour une forme tronquée de Tat, avec seulement les 72 premiers acides aminés. Cette forme est générée au stade tardif du cycle d'infection par le VIH-1. La forme tronquée de 86 résidus de Tat, produite tôt au cours de l'infection, est générée en raison d'un codon stop prématuré dans

le second exon. Bien que la forme complète de Tat à 101 acides aminés soit prédominante dans les isolats cliniques du VIH-1, Tat 86 et 72 sont plus, largement, utilisés dans les études *in vitro* (Zhang et al., 2014). La stabilité et l'activité de ces 3 formes de Tat sont distinctes. Elles sont ubiquitinées sur la lysine K48, pour être dégradées par le protéasome. Cependant, le traitement par MG132 n'a eu que peu d'effet sur la stabilité et l'activité transcriptionnelle de Tat 101, n'a que légèrement affecté Tat 86, mais a augmenté le niveau de stabilité et d'activité de Tat72. La quantité de mRNA de ces protéines est restée inchangée. Ces résultats démontrent que la stabilité de Tat est modulée par son ubiquitination sur K48 et sa région carboxy-terminale dont la troncation la rend fragile et sensible à la dégradation par le protéasome (Zhang et al., 2014). Dans nos conditions expérimentales, nous avons testé la capacité de KAP1 à dégrader les isoformes 101 et 86 de Tat (résultats non présentés). Nous avons observé que KAP1 était capable de dégrader ces 2 formes de Tat, et que le traitement par le MG132 s'est montré tout autant efficace pour contrecarrer cette dégradation. Ainsi, il serait intéressant d'observer le niveau d'ubiquitination de Tat en présence de KAP1 et de tester l'aptitude de KAP1 à dégrader des mutants de Tat dont la K48 a été mutée. Ces résultats permettront d'apprécier si la dégradation protéosomale de Tat médiée par KAP1 est liée à des modifications initiales par ubiquitination.

4.2- Mécanismes conduisant à la dégradation de Tat

Tat stimule l'élongation de la transcription du VIH-1, grâce au facteur cellulaire P-TEFb. Une étude, qui avait pour cible de bloquer la transcription du VIH par construction de mutants dominants négatifs de la CycT1, a montré un effet négatif puissant sur la transcription Tat-dépendante. Une faible expression de Tat, dont les niveaux ont été restaurés par l'utilisation d'inhibiteur du protéasome a, également, été observée (Jadlowsky et al., 2008). Ces observations ont été renforcées par un travail où il a été révélé que la CycT1 était impliquée dans la stabilité de Tat. En effet, la déplétion par siRNA de la CycT1 a abouti à la dégradation par le protéasome de Tat et à l'inhibition de l'expression génique du VIH-1 (Imai et al., 2009). Ainsi, ces mutants de la CycT1 pourraient représenter une nouvelle classe d'inhibiteurs spécifiques de la transcription du VIH, qui favoriseraient une dégradation rapide de Tat, et pourraient, potentiellement, être utilisés dans la conception de thérapies antivirales.

Le facteur suppresseur de tumeur ARF (Alternative Reading Frame), est capable d'inhiber la transcription du VIH-1 par induction d'une dégradation protéosomale de Tat, indépendamment de la voie d'ubiquitination (Gargano et al., 2008).

Lors de l'infection par le VIH-1, les glycoprotéines d'enveloppes virales induisent une apoptose, dépendante de l'autophagie, des lymphocytes T CD4+, qui ont été en contact avec des cellules infectées, sans être elle-même infectées. Ce mécanisme contribue à la perte des lymphocytes T CD4+ (Espert et al., 2006). En revanche, dans les cellules T CD4+ infectées de manière productive, le VIH-1 est capable de bloquer l'autophagie induite par Env afin d'éviter l'effet antiviral qui en résulte (Espert et al., 2009). Dans le but de faire face à cette restriction de l'autophagie induite par l'infection à VIH-1 dans les lymphocytes T CD4+, le récepteur à l'autophagie p62 interagit avec Tat, de manière indépendante à l'ubiquitination et l'orienté vers une dégradation par la voie lysosomale. Ainsi, l'effet anti-VIH de l'autophagie est, spécifiquement, dû à la dégradation de Tat. Cependant, ce processus est, rapidement, contrecarré par le virus, pour favoriser sa réplication et sa propagation (Sagnier et al., 2015).

Récemment, un RNA non codant, dénommé NRON, qui est, fortement, exprimé dans les lymphocytes T CD4+ quiescents, pourrait être impliqué dans la latence du VIH-1. La latence surviendrait par suppression de la transcription virale, suite à la diminution de l'abondance cellulaire de Tat, par induction spécifique de sa dégradation. NRON lie, directement, Tat aux composants de la voie ubiquitine/protéasome, CUL4B et PSMD11 (Proteasome 26S subunit, non-ATPase 11), facilitant ainsi la dégradation de Tat. La déplétion de NRON, en particulier en combinaison avec un HDACi, SAHA, réactive de manière significative la production virale à partir des lymphocytes T CD4+ primaires infectés latents. De ce fait, la manipulation de NRON pourrait être une nouvelle approche pour le développement de LRAs (Li et al., 2016b).

En plus des facteurs cellulaires, la nucléocapside du virus est capable d'interagir avec Tat et d'entraîner sa dégradation protéasomale. Le niveau de Tat, en présence de la NC, a été augmenté après traitement avec l'inhibiteur du protéasome, le MG132. L'état d'ubiquitination de Tat n'a pas semblé augmenter en présence de la NC, suggérant que la dégradation du protéasome est indépendante de cette modification. Ces travaux ont suggéré que la NC, issue de la protéolyse prématurée de Gag, peut contrôler l'activation transcriptionnelle par Tat à un stade tardif du cycle d'infection virale (Hong et al., 2013).

Enfin, des molécules telles que le triptolide, curcumin ou de petites molécules dévirées de la digoxine et issues d'un screen, ont montré leur aptitude à dégrader Tat par la voie du protéasome. Ces molécules serviraient de point de départ à l'élaboration d'une nouvelle approche thérapeutique contre le VIH-1 (Ali and Banerjea, 2016; Balachandran et al., 2017; Wan and Chen, 2014).

4.3- Mécanismes conduisant à la stabilisation de Tat

La modification inhibitrice de l'activité de Tat par méthylation des arginines 52 et 53, induites par PRMT6, s'est montrée capable d'augmenter la stabilité de Tat, en empêchant sa dégradation par le protéasome, mais sans modifier son niveau d'ubiquitination. Ainsi, il a été suggéré que PRMT6 génère un sous-ensemble stable de molécules Tat, capables d'effectuer des fonctions autres que celle de l'expression des gènes du VIH-1 (Sivakumaran et al., 2009). De même, la déubiquitinase USP7, augmente la production virale par stabilisation de Tat, en favorisant sa déubiquitination. L'inhibition ou la déplétion d'USP7 entraîne la déstabilisation de Tat, qui conduit à sa dégradation protéasomale. De façon intéressante, les taux d'USP7 endogènes sont augmentés après infection par le VIH-1. Par conséquent, la stabilisation de Tat par USP7 conduit à une élévation de la production virale, qui à son tour augmente le niveau d'USP7 (Ali et al., 2017).

Grâce à un screen siRNA, l'ubiquitine E3 ligase PJA2 (Praja RING finger ubiquitin ligase 2), que nous retrouvons dans nos résultats de protéomique comme nouveau partenaire de CTIP2, entraîne une polyubiquitination de Tat sur les lysines 27, 29 et 33 sans induire sa dégradation. Ces modifications ont pour résultats : une amélioration de la transcription du VIH-1 et un renforcement de l'interaction Tat/P-TEFb. En effet, la PJA2 stabilise Tat, car la déplétion de PJA2 a entraîné une diminution de son accumulation (Faust et al., 2017).

5- La voie SUMO est impliquée dans la dégradation de Tat

Comme mentionné ci-dessus, l'importance des voies de l'ubiquitination dans la dégradation protéasomale de Tat a, largement, été étudiée. Compte tenu de l'activité SUMO ligase exercée par les domaines RBCC et PHD de KAP1 ayant pour cibles respectives IRF7 et Vps34 (Liang et al., 2011; Yang et al., 2013b) ou bien le domaine Bromo de KAP1 (Ivanov et al., 2007), nous avons étudié le rôle de la voie SUMO dans la dégradation de Tat.

L'utilisation d'inhibiteurs de SUMO protéases (Iodoacétamide et N-Ethylmaléimide) nous ont permis de renforcer la dégradation de Tat par KAP1, de même que l'interaction entre ces 2 protéines. De façon plus spécifique, nous montrons que la SUMO ligase UBC9 interagit avec Tat pour conduire à sa dégradation. A l'inverse, la SUMO protéase SENP1 protège Tat de cette dégradation. Ainsi, nous montrons, pour la première fois, que la voie SUMO est impliquée dans la dégradation de Tat par le protéasome. Cette dégradation implique, fortement, le domaine Bromo de KAP1 et, à une moindre mesure, le domaine PHD, puisque nous observons une faible restauration de l'expression de Tat en l'absence de PHD. La délétion du domaine Bromo, et

même une mutation ponctuelle de ce domaine, permet de restaurer l'expression de Tat. Le domaine Bromo est connu pour être modifié par sumoylation et confère à KAP1 son activité répressive. La phosphorylation de la sérine 824 entraîne une perte de cette répression (Li et al., 2007b). Il est ainsi possible que pour exercer son action menant à la dégradation protéasomale de Tat, KAP1 doit être sous sa forme sumoylée répressive.

Tat est soumis à de nombreuses modifications post-traductionnelles qui ont divers impacts sur sa stabilité et son activité transcriptionnelle. A ce jour, aucune forme sumoylée de Tat n'a été rapportée. Comme la voie SUMO est capable de renforcer la dégradation de Tat, nous avons suggéré que Tat pouvait être modifiée par sumoylation et soumise à une dégradation par le protéasome. L'observation d'une bande entre 25 et 37 kDa, en présence de HA-SUMO2 et qui disparaît en présence de KAP1, a été suggérée pour être Tat SUMO (**figure 7 D3, colonne 4**). Le choix d'utilisation de SUMO2 dans ces expériences réside dans le fait qu'elle soit capable de former des chaînes sur les protéines contrairement à SUMO1 qui, *in vivo*, agit plutôt comme un terminateur de chaîne (Matic et al., 2008). Des expériences complémentaires de co-immunoprécipitation entre Tat et SUMO sont nécessaires pour valider la sumoylation de Tat. De même qu'un traitement au MG132 permettrait l'obtention d'une stabilisation de cette bande, qui paraît être Tat SUMO, et qui disparaît en présence de KAP1 (**figure 7 D3, colonne 5**).

Enfin, il est bien décrit que les lysines modifiées par SUMO peuvent donner suite à une modification par ubiquitination. Cette réaction est catalysée par un groupe d'enzymes ubiquitine ligase nommées : STUbLs (SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases), qui ciblent, spécifiquement, les protéines sumoylées. Chez l'homme, RNF4 et RNF11 sont des STUbLs qui donnent naissance à une chaîne hybride SUMO-ubiquitine, aboutissant à une dégradation par le protéasome (Erker et al., 2013). RNF4 est une STUbL pour KAP1 dans le contexte de dommages au DNA, afin d'assurer un turnover en cas de stress génotoxique. La phosphorylation de S824, induite par les cassures doubles brins du DNA, favorise le recrutement simultané de KAP1 phospho-sérine-824 et de KAP1 sumoylée sur la lysine 676, aux domaines de reconnaissance respectifs ARM (Arginin-Aich Motif) et SIM de RNF4. Ce recrutement conduit à l'ubiquitination de la lysine 48 de KAP1 et à sa dégradation par le protéasome (Kuo et al., 2014). Ces phénomènes intéressants de lien entre les modifications post-traductionnelles sont de plus en plus étudiés. Cependant, très peu d'approches existent pour déterminer les relations entre ces modifications. Dernièrement, une étude s'est intéressée aux liens existants entre les modifications de type SUMO et ubiquitine durant la dégradation par le protéasome, et a permis de développer des méthodes permettant l'identification de protéines co-modifiées, en utilisant la spectrométrie de masse (Cuijpers et al., 2017).

Ainsi, notre hypothèse de travail porte sur la possibilité de la présence successive de 2 modifications post-traductionnelles survenant sur le transactivateur viral Tat. Nous avons observé que Tat est dégradé par KAP1 en passant par la voie du protéasome. De plus, la Voie SUMO s'est montrée impliquée dans cette dégradation puisque UBC9 interagit avec Tat et entraîne sa dégradation et SENP1 contrecarre cette dégradation et restaure l'expression de Tat. Il est possible que Tat soit d'abord sumoylé par KAP1. Cette modification serait suivie d'une ubiquitination de Tat, grâce à l'intervention de RNF4, suivie d'une dégradation subséquente de Tat. Des expériences ultérieures de spectrométrie de masse et de sumoylation *in vitro*, permettront de confirmer ou de réfuter cette hypothèse, où finalement la dégradation de Tat surviendrait sans aucune modification post-traductionnelle, mais dépendrait au contraire de l'état de sumoylation de KAP1.

6- KAP1 et UBC9 inhibent la transcription du VIH-1

Par mesure de l'expression virale du VIH-1 et de l'activité du promoteur LTR, nous constatons que KAP1 et UBC9 inhibent la transcription du VIH-1. La déplétion de ces 2 protéines, au contraire, renforce la transcription. De plus, nous constatons une coopération fonctionnelle entre CTIP2 et KAP1 pour la répression de la transcription virale. Les effets inhibiteurs de CTIP2 sur la transcription virale, par recrutement des complexes NuRD, SUV39h1 et LSD1 sont connus et décrits précédemment. Ainsi, nous démontrons la présence d'un nouveau facteur répresseur de la transcription du VIH-1. KAP1 exerce sa fonction de répresseur de gènes principalement sous sa forme sumoylée au niveau du domaine Bromo. Il devient de ce fait capable d'interagir avec les complexes répresseurs NuRD et SETDB1 qui induisent une structure hétérochromatinienne notamment par déacétylation des histones par les HDACs et par induction de la marque H3K9me3. Par son domaine de liaison avec HP1, il contribue, également, à la génération de cette chromatine silencieuse.

Par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine dans des modèles cellulaires de latence virale CHME5 (Wires et al., 2012), il serait intéressant de voir si KAP1 est impliqué dans la latence virale par étude de son enrichissement au promoteur de ces cellules infectées de façon latente. Des expériences de réactivation virale contribueraient à examiner le déplacement de KAP1 du promoteur ou à la génération de sa forme non répressive, phosphorylée sur la sérine 824, mais qui resterait toujours liée au promoteur viral. De même, la déplétion de KAP1 permettrait de voir quelle serait son influence sur la réactivation de modèles cellulaires de latence virale, par dérégulation du promoteur viral, suite au départ des résidus SUMO, HDAC1, SETDB1, HP-1, UBC9 et la marque H3K9me3. Enfin, KAP1 pourrait réprimer la transcription,

grâce à son action inhibitrice de l'interaction entre NF- κ B/P65 et p300 (Kamitani et al., 2011), ce qui régule, négativement, l'acétylation de NF- κ B qui est nécessaire à sa rétention nucléaire. KAP1 a été identifié comme faisant partie du complexe 7SK snRNP tout comme CTIP2 (Cherrier et al., 2013; McNamara et al., 2016). La faible coopérativité que nous observons dans l'inhibition de la transcription du VIH-1 pourrait s'expliquer par l'appartenance de ces deux répresseurs à un même complexe protéique. Des expériences de co-immunoprécipitations séquentielles permettraient de valider l'appartenance de ces deux protéines à ce même complexe 7SK snRNP. Etant donné la capacité de CTIP2 à recruter de multiples complexes répresseurs, il est à noter qu'il pourrait servir de plateforme d'ancrage à KAP1 au promoteur viral. En ciblant l'association de KAP1 avec le promoteur viral après déplétion de CTIP2, nous démontrerons la capacité de CTIP2 à servir de plate-forme de recrutement pour KAP1 sur le promoteur viral.

KAP1 est, également, capable de réprimer fortement l'activité transcriptionnelle de Tat. En effet, la surexpression, de même que la déplétion de KAP1, ont, respectivement, inhibé ou stimulé la transactivation virale médiée par Tat. Comme le mutant constitutivement phosphorylé de KAP1 (S824D) perdait sa capacité à dégrader Tat, (**figure 6 D, colonne 4**), nous avons étudié ses effets sur l'activité transcriptionnelle médiée par Tat. Ces essais ont pour but de savoir si l'inhibition de la transcription Tat dépendante est liée à sa dégradation. Des résultats préliminaires montrent, de façon surprenante, que KAP1 S824D possède une action répressive sur l'activité de Tat (résultats non présentés). Nous avons, donc, suggéré qu'en plus de l'importance de la voie SUMO et ubiquitine dans la dégradation protéasomale de Tat, un événement de répression surviendrait en amont de ces modifications et servirait à inhiber Tat. Ainsi, KAP1 exercerait des fonctions répressives sur Tat, où la dégradation ne serait pas l'unique phénomène responsable de l'inhibition de la phase tardive de la transcription du VIH-1. Il est décrit que p300 peut être modifiée par SUMO, ce qui conduit à la répression de cette dernière par augmentation de son interaction avec HDAC6 (Girdwood et al., 2003). Bien que p300 soit capable de promouvoir sa propre sumoylation (Park et al., 2017), il est possible que KAP1 contribue à renforcer cette modification. Ce phénomène aura pour effet : une inhibition de l'acétylation de Tat, qui surviendrait en amont de sa dégradation, et un blocage de l'acétylation des histones. Ces modifications aboutiront à une répression de la phase précoce et tardive Tat dépendante de la transcription virale.

Les modèles de lignées cellulaires ne sont pas parfaits et ne reflètent pas impeccablement la diversité des mécanismes qui se produisent *in vivo*. Par conséquent, il faudra étudier plus en détail le rôle de KAP1 dans la régulation de la transcription du VIH-1 dans un contexte

expérimental plus pertinent du point de vue physiologique. Il serait intéressant d'utiliser des modèles de latence post-intégrative du VIH-1 comme les cellules T CD4 + primaires quiescentes et les macrophages isolés à partir du sang de patients VIH-1 traités aux HAART. Le recrutement de KAP1 au promoteur viral sera évalué par ChIP dans ces cellules primaires en présence ou non de traitements de réactivation. Parallèlement, la contribution de KAP1 à la latence du VIH-1 sera étudiée par quantification de p24 dans le surnageant de culture et des transcrits de TAR / ENV par RT-qPCR après déplétion de KAP1 par siRNA dans ces cellules primaires.

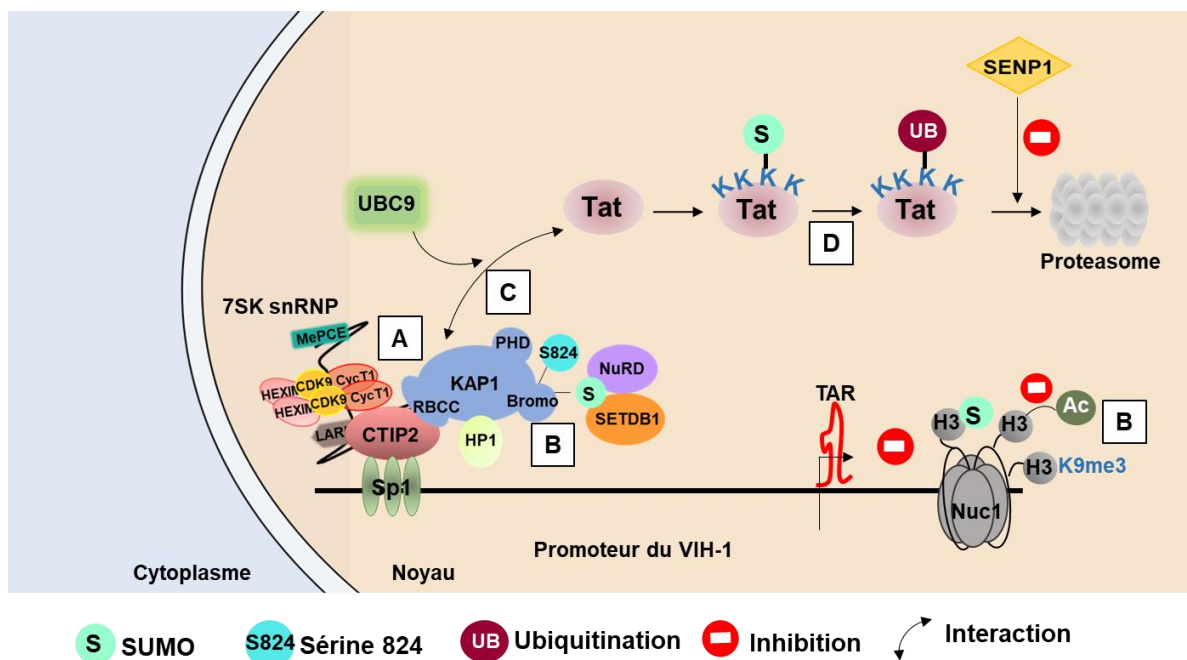


Figure 47 : Modèle hypothétique de la latence du VIH-1 médiée par KAP1. (A) KAP1 interagit avec CTIP2 et coopère avec CTIP2 dans l'inhibition de la transcription du VIH-1. Cette coopération s'exercerait grâce à l'appartenance de CTIP2 et KAP1 au même complexe 7SK snRNP. (B) KAP1 contribuerait à la latence du VIH-1 par recrutement des complexes répresseurs NuRD, SETDB1, HP1 grâce à son activité de SUMO E3 ligase qui conduirait aux marques épigénétiques telles que H3 déacétylées, H3K9me3 et H3 sumoylées, qui seraient à l'origine d'une chromatine silencieuse. (C) KAP1 interagit avec Tat, réprime son activité transcriptionnelle et coopère avec CTIP2 dans cette répression. (D) La voie SUMO est impliquée dans la dégradation de Tat, puisqu'UBC9 et KAP1 dégradent Tat et SENP1 contrecarre cette dégradation. Tat serait initialement, inhibé puis modifié, successivement, par sumoylation et ubiquitination, avant d'être orienté vers une dégradation par le protéasome (source personnelle).

7- KAP1 et la voie SUMO comme nouvelles cibles dans les stratégies LRAs ?

La régulation positive de KAP1 dans les tissus tumoraux de cancers gastrique, ovariens, gliomes et seins est associée à une grande agressivité et à de faibles taux de survie. La surexpression de KAP1 dans le sang périphérique de patients atteints de cancer gastrique en fait

un excellent biomarqueur prédictif du stade évolutif du cancer (pour revue (Czerwińska et al., 2017)). Nos résultats montrent clairement les effets répresseurs de KAP1 sur les phases précoce et tardive de la transcription du VIH-1 et suggèrent son implication dans l'établissement et la persistance de la latence virale. Par transposition à ce qui a été observé en cancérologie, il est possible que des taux sanguins élevés ou une régulation génique positive de KAP1 puissent être utilisés comme marqueurs associés à une latence virale accrue ou à la présence d'un large réservoir viral. Des traitements tels que la doxorubicine et la chloroquine, utilisés, respectivement, en thérapie anti-cancéreuse (vessie, sein, estomac, poumon, ovaires, thyroïde et lymphome de Hodgkin) (Rivankar, 2014), et comme antipaludique et réactivateur de l'EBV (Li et al., 2017), ont montré leur capacité à induire la phosphorylation de la S824 de KAP1 et à une perte de son action répressive (Lee et al., 2007b). Ces molécules, n'ayant pas été utilisées dans les stratégies de réactivation de la latence virale, pourraient constituer une nouvelle voie d'investigation pour le développement de LRAs.

Par nos résultats, nous démontrons l'importance de la voie SUMO dans la dégradation du facteur clé de la transcription du VIH-1 : Tat. UBC9, en tant qu'enzyme de conjugaison de SUMO et KAP1 comme SUMO ligase, sont capables d'induire la dégradation de Tat. A l'inverse, la SUMO protéase SENP1 restaure l'expression de Tat et empêche cette dégradation. UBC9 et KAP1 sont capables d'inhiber la transcription Tat dépendante du VIH-1. Ainsi, nous démontrons de façon évidente l'implication de la voie SUMO dans la régulation de la transcription du VIH-1 et suggérons son implication dans la latence virale.

Étant donné les rôles que joue la voie SUMO dans les processus cellulaires et dans les états pathologiques, le ciblage pharmacologique des enzymes de sumoylation constitue des voies thérapeutiques prometteuses. Un nombre croissant de petites molécules inhibitrices, ciblant les enzymes E1 ou UBC9 ont été identifiées. Actuellement, les inhibiteurs qui ciblent E1 comprennent l'acide ginkgolique (GA) et son analogue structural l'acide anacardique (AA), davidiine, kerriamycine B, spectomycine B1, chaetochromine A et viomelleine. Malheureusement, la spectomycine B1 n'est pas disponible dans le commerce et son isolement coûteux l'exclut des études systématiques. Les inhibiteurs d'UBC9 comprennent le 2-D08 (2,3,4-trihydroxyflavone), le GSK145A et la spectomycine B1 (Licciardello and Kubicek, 2016; Suzawa et al., 2015). En fonction du contexte, il est aussi possible d'initier d'autres approches, qui impliqueraient l'inhibition des enzymes SUMO protéases ou E3 ligases. Pratiquement, aucun des inhibiteurs de SENPs ne sont dérivés de composés naturels, ils sont principalement issus d'un criblage virtuel et leur potentiel thérapeutique et fonctionnel nécessite d'être évalués plus en détail (Kumar and Zhang, 2015; Madu et al., 2013). Un inhibiteur de

SENP1 et 2, nommé SPI-1 (PubChem ID : NSC5068), issu d'un criblage virtuel, a montré une activité anti-VIH-1. Dans cette étude, les virions VIH-1, produits à partir de cellules traitées avec SPI-1, sont capables d'effectuer l'entrée cellulaire et la transcription inverse, mais ne parviennent pas à s'intégrer dans le génome de l'hôte. Ces caractéristiques étaient associées à l'incorporation dans le virion d'une intégrase modifiée par SUMO (Madu et al., 2015). Dans une étude récente, le Momordin Ic, un composé naturel, issu du fruit *Kochia scoparia*, a été identifié comme un nouvel inhibiteur de SENP1. Il est capable d'inhiber, *in vitro* et *in vivo*, la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques (Wu et al., 2016).

A présent, aucun de ces inhibiteurs de la voie SUMO n'a été étudié pour ses effets sur la transcription du VIH-1. Seuls les bezotriazoles, qui sont capables de bloquer la sumoylation de STAT5, représentent une cible pour les stratégies d'éradication du VIH-1.

L'inclusion des inhibiteurs de la voie SUMO dans des études, *in vitro* et *ex vivo*, de réactivation de la latence virale et de régulation de l'activité transcriptionnelle, serait d'une importance considérable au développement de thérapies potentielles dans le cadre de stratégies de réactivation des réservoirs. Comme l'évaluation plus poussée de la pharmacocinétique, de la toxicité et des effets secondaires de ces médicaments n'est pas connue, elle serait à évaluer avec la plus grande prudence.

Bibliographie

- Abbas, W., and Herbein, G. (2012). Molecular Understanding of HIV-1 Latency. *Adv. Virol.* 2012, 574967.
- Abdel-Mohsen, M., Kuri-Cervantes, L., Grau-Exposito, J., Spivak, A.M., Nell, R.A., Tomescu, C., Vadrevu, S.K., Giron, L.B., Serra-Peinado, C., Genescà, M., et al. (2018). CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Sci. Transl. Med.* 10.
- Achuthan, V., Ferreira, J.M., Sowd, G.A., Puray-Chavez, M., McDougall, W.M., Paulucci-Holthauzen, A., Wu, X., Fadel, H.J., Poeschla, E.M., Multani, A.S., et al. (2018). Capsid-CPSF6 Interaction Licenses Nuclear HIV-1 Trafficking to Sites of Viral DNA Integration. *Cell Host Microbe* 24, 392-404.e8.
- Adamson, D.C., Kopnisky, K.L., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (1999). Mechanisms and structural determinants of HIV-1 coat protein, gp41-induced neurotoxicity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 64–71.
- Adorisio, S., Fierabracci, A., Muscari, I., Liberati, A.M., Ayroldi, E., Migliorati, G., Thuy, T.T., Riccardi, C., and Delfino, D.V. (2017). SUMO proteins: Guardians of immune system. *J. Autoimmun.* 84, 21–28.
- Ahmed, Z., Kawamura, T., Shimada, S., and Piguet, V. (2015). The role of human dendritic cells in HIV-1 infection. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1225–1233.
- Aiken, C. (2006). Viral and cellular factors that regulate HIV-1 uncoating. *Curr. Opin. HIV AIDS* 1, 194–199.
- Albini, A., Soldi, R., Giunciuglio, D., Giraudo, E., Benelli, R., Primo, L., Noonan, D., Salio, M., Camussi, G., Rockl, W., et al. (1996). The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat. Med.* 2, 1371–1375.
- Albright, A.V., Strizki, J., Harouse, J.M., Lavi, E., O'Connor, M., and González-Scarano, F. (1996). HIV-1 infection of cultured human adult oligodendrocytes. *Virology* 217, 211–219.
- Ali, A., and Banerjea, A.C. (2016). Curcumin inhibits HIV-1 by promoting Tat protein degradation. *Sci. Rep.* 6, 27539.
- Ali, A., Raja, R., Farooqui, S.R., Ahmad, S., and Banerjea, A.C. (2017). USP7 deubiquitinase controls HIV-1 production by stabilizing Tat protein. *Biochem. J.* 474, 1653–1668.
- Allouch, A., Di Primio, C., Alpi, E., Lusic, M., Arosio, D., Giacca, M., and Cereseto, A. (2011). The TRIM Family Protein KAP1 Inhibits HIV-1 Integration. *Cell Host Microbe* 9, 484–495.
- Alontaga, A.Y., Ambaye, N.D., Li, Y.-J., Vega, R., Chen, C.-H., Bzymek, K.P., Williams, J.C., Hu, W., and Chen, Y. (2016). Observation of an E2 (Ubc9)-homodimer by crystallography. *Data Brief* 7, 195–200.
- Ammosova, T., Jerebtsova, M., Beullens, M., Lesage, B., Jackson, A., Kashanchi, F., Southerland, W., Gordeuk, V.R., Bollen, M., and Nekhai, S. (2005). Nuclear targeting of protein phosphatase-1 by HIV-1 Tat protein. *J. Biol. Chem.* 280, 36364–36371.

- Ammosova, T., Berro, R., Jerebtsova, M., Jackson, A., Charles, S., Klase, Z., Southerland, W., Gordeuk, V.R., Kashanchi, F., and Nekhai, S. (2006). Phosphorylation of HIV-1 Tat by CDK2 in HIV-1 transcription. *Retrovirology* 3, 78.
- Ammosova, T., Yedavalli, V.R.K., Niu, X., Jerebtsova, M., Van Eynde, A., Beullens, M., Bollen, M., Jeang, K.-T., and Nekhai, S. (2011). Expression of a protein phosphatase 1 inhibitor, cdNIPP1, increases CDK9 threonine 186 phosphorylation and inhibits HIV-1 transcription. *J. Biol. Chem.* 286, 3798–3804.
- Andersen, J.L., Le Rouzic, E., and Planelles, V. (2008). HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp. Mol. Pathol.* 85, 2–10.
- András, I.E., and Toborek, M. (2011). HIV-1-induced alterations of claudin-5 expression at the blood-brain barrier level. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 762, 355–370.
- Annunziato, A.T. (2008). DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin | Learn Science at Scitable.
- Anton, P.A., Mitsuyasu, R.T., Deeks, S.G., Scadden, D.T., Wagner, B., Huang, C., Macken, C., Richman, D.D., Christopherson, C., Borellini, F., et al. (2003). Multiple measures of HIV burden in blood and tissue are correlated with each other but not with clinical parameters in aviremic subjects. *AIDS Lond. Engl.* 17, 53–63.
- Aoki, Y., and Tosato, G. (2004). HIV-1 Tat enhances Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) infectivity. *Blood* 104, 810–814.
- Araínga, M., Edagwa, B., Mosley, R.L., Poluektova, L.Y., Gorantla, S., and Gendelman, H.E. (2017). A mature macrophage is a principal HIV-1 cellular reservoir in humanized mice after treatment with long acting antiretroviral therapy. *Retrovirology* 14, 17.
- Archin, N.M., Liberty, A.L., Kashuba, A.D., Choudhary, S.K., Kuruc, J.D., Crooks, A.M., Parker, D.C., Anderson, E.M., Kearney, M.F., Strain, M.C., et al. (2012). Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 487, 482–485.
- Arhel, N. (2010). Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 7, 96.
- Arhel, N., Genovesio, A., Kim, K.-A., Miko, S., Perret, E., Olivo-Marin, J.-C., Shorte, S., and Charneau, P. (2006a). Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat. Methods* 3, 817–824.
- Arhel, N., Munier, S., Souque, P., Mollier, K., and Charneau, P. (2006b). Nuclear import defect of human immunodeficiency virus type 1 DNA flap mutants is not dependent on the viral strain or target cell type. *J. Virol.* 80, 10262–10269.
- Arhel, N.J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., Prévost, M.-C., Allen, T.D., and Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J.* 26, 3025–3037.
- Autran, B., Descours, B., Avettand-Fenoel, V., and Rouzioux, C. (2011). Elite controllers as a model of functional cure. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 181–187.
- Balachandran, A., Wong, R., Stoilov, P., Pan, S., Blencowe, B., Cheung, P., Harrigan, P.R., and Cochrane, A. (2017). Identification of small molecule modulators of HIV-1 Tat and Rev protein accumulation. *Retrovirology* 14.

- Barat, C., Proust, A., Deshiere, A., Leboeuf, M., Drouin, J., and Tremblay, M.J. (2018). Astrocytes sustain long-term productive HIV-1 infection without establishment of reactivable viral latency. *Glia*.
- Barboric, M., Yik, J.H.N., Czudnochowski, N., Yang, Z., Chen, R., Contreras, X., Geyer, M., Matija Peterlin, B., and Zhou, Q. (2007). Tat competes with HEXIM1 to increase the active pool of P-TEFb for HIV-1 transcription. *Nucleic Acids Res.* 35, 2003–2012.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautuet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.
- Barton, K., Winckelmann, A., and Palmer, S. (2016). HIV-1 Reservoirs During Suppressive Therapy. *Trends Microbiol.* 24, 345–355.
- 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.
- Bentz, G.L., Moss, C.R., Whitehurst, C.B., Moody, C.A., and Pagano, J.S. (2015). LMP1-Induced Sumoylation Influences the Maintenance of Epstein-Barr Virus Latency through KAP1. *J. Virol.* 89, 7465–7477.
- Bergamaschi, A., and Pancino, G. (2010). Host hindrance to HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Retrovirology* 7, 31.
- Bethel-Brown, C., Yao, H., Callen, S., Lee, Y.H., Dash, P.K., Kumar, A., and Buch, S. (2011). HIV-1 Tat-mediated induction of platelet-derived growth factor in astrocytes: role of early growth response gene 1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 4119–4129.
- Bethel-Brown, C., Yao, H., Hu, G., and Buch, S. (2012). Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB-mediated induction of monocyte chemoattractant protein 1 in human astrocytes: implications for HIV-associated neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* 9, 262.
- Biglione, S., Byers, S.A., Price, J.P., Nguyen, V.T., Bensaude, O., Price, D.H., and Maury, W. (2007). Inhibition of HIV-1 replication by P-TEFb inhibitors DRB, seliciclib and flavopiridol correlates with release of free P-TEFb from the large, inactive form of the complex. *Retrovirology* 4, 47.
- Bisgrove, D.A., Mahmoudi, T., Henklein, P., and Verdin, E. (2007). Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13690–13695.
- Blazkova, J., Trejbalova, K., Gondois-Rey, F., Halfon, P., Philibert, P., Guiguen, A., Verdin, E., Olive, D., Van Lint, C., Hejnar, J., et al. (2009). CpG methylation controls reactivation of HIV from latency. *PLoS Pathog.* 5, e1000554.
- Bluman, E.M., Bartynski, K.J., Avalos, B.R., and Caligiuri, M.A. (1996). Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *J. Clin. Invest.* 97, 2722–2727.
- Blumenthal, R., Durell, S., and Viard, M. (2012). HIV Entry and Envelope Glycoprotein-mediated Fusion. *J. Biol. Chem.* 287, 40841.

- Boehm, D., Jeng, M., Camus, G., Gramatica, A., Schwarzer, R., Johnson, J.R., Hull, P.A., Montano, M., Sakane, N., Pagans, S., et al. (2017). SMYD2-Mediated Histone Methylation Contributes to HIV-1 Latency. *Cell Host Microbe* 21, 569-579.e6.
- Boggio, R., Passafaro, A., and Chiocca, S. (2007). Targeting SUMO E1 to ubiquitin ligases: a viral strategy to counteract sumoylation. *J. Biol. Chem.* 282, 15376–15382.
- Bohl, C.R., Abrahamyan, L.G., and Wood, C. (2013). Human Ubc9 Is Involved in Intracellular HIV-1 Env Stability after Trafficking out of the Trans-Golgi Network in a Gag Dependent Manner. *PLoS ONE* 8.
- Bona, R., Baroncelli, S., D’Ettorre, G., Andreotti, M., Ceccarelli, G., Filati, P., Leone, P., Blasi, M., Michelini, Z., Galluzzo, C.M., et al. (2013). Effects of Raltegravir on 2-Long Terminal Repeat Circle Junctions in HIV Type 1 Viremic and Aviremic Patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 29, 1365–1369.
- Borducchi, E.N., Cabral, C., Stephenson, K.E., Liu, J., Abbink, P., Ng’ang’a, D., Nkolola, J.P., Brinkman, A.L., Peter, L., Lee, B.C., et al. (2016). Ad26/MVA Therapeutic Vaccination with TLR7 Stimulation in SIV-Infected Rhesus Monkeys. *Nature* 540, 284–287.
- Bosque, A., Nilson, K.A., Macedo, A.B., Spivak, A.M., Archin, N.M., Van Wagoner, R.M., Martins, L.J., Novis, C.L., Szaniawski, M.A., Ireland, C.M., et al. (2017). Benzotriazoles Reactivate Latent HIV-1 through Inactivation of STAT5 SUMOylation. *Cell Rep.* 18, 1324–1334.
- Bouchat, S., Gatot, J.-S., Kabeya, K., Cardona, C., Colin, L., Herbein, G., De Wit, S., Clumeck, N., Lambotte, O., Rouzioux, C., et al. (2012). Histone methyltransferase inhibitors induce HIV-1 recovery in resting CD4(+) T cells from HIV-1-infected HAART-treated patients. *AIDS Lond. Engl.* 26, 1473–1482.
- Bouchat, S., Delacourt, N., Kula, A., Darcis, G., Van Driessche, B., Corazza, F., Gatot, J.-S., Melard, A., Vanhulle, C., Kabeya, K., et al. (2015). Sequential treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and deacetylase inhibitors reactivates HIV-1. *EMBO Mol. Med.* 8, 117–138.
- Bouchat, S., Delacourt, N., Kula, A., Darcis, G., Van Driessche, B., Corazza, F., Gatot, J., Melard, A., Vanhulle, C., Kabeya, K., et al. (2016). Sequential treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and deacetylase inhibitors reactivates HIV-1. *EMBO Mol. Med.* 8, 117–138.
- Bouillé, P., Subra, F., Mouscadet, J.F., and Auclair, C. (1999). Antisense-mediated repression of DNA topoisomerase II expression leads to an impairment of HIV-1 replicative cycle. *J. Mol. Biol.* 285, 945–954.
- Boulanger, M.-C., Liang, C., Russell, R.S., Lin, R., Bedford, M.T., Wainberg, M.A., and Richard, S. (2005). Methylation of Tat by PRMT6 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J. Virol.* 79, 124–131.
- Bouras, T., Fu, M., Sauve, A.A., Wang, F., Quong, A.A., Perkins, N.D., Hay, R.T., Gu, W., and Pestell, R.G. (2005). SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J. Biol. Chem.* 280, 10264–10276.
- Bouyac-Bertoia, M., Dvorin, J.D., Fouchier, R.A., Jenkins, Y., Meyer, B.E., Wu, L.I., Emerman, M., and Malim, M.H. (2001). HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol. Cell* 7, 1025–1035.

- Bracq, L., Xie, M., Benichou, S., and Bouchet, J. (2018). Mechanisms for Cell-to-Cell Transmission of HIV-1. *Front. Immunol.* *9*.
- Brake, D.A., Debouck, C., and Biesecker, G. (1990). Identification of an Arg-Gly-Asp (RGD) cell adhesion site in human immunodeficiency virus type 1 transactivation protein, tat. *J. Cell Biol.* *111*, 1275–1281.
- Brenchley, J.M., Hill, B.J., Ambrozak, D.R., Price, D.A., Guenaga, F.J., Casazza, J.P., Kuruppu, J., Yazdani, J., Migueles, S.A., Connors, M., et al. (2004). T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J. Virol.* *78*, 1160–1168.
- Brès, V., Tagami, H., Péloponèse, J.-M., Loret, E., Jeang, K.-T., Nakatani, Y., Emiliani, S., Benkirane, M., and Kiernan, R.E. (2002). Differential acetylation of Tat coordinates its interaction with the co-activators cyclin T1 and PCAF. *EMBO J.* *21*, 6811.
- Brès, V., Kiernan, R.E., Linares, L.K., Chable-Bessia, C., Plechakova, O., Tréand, C., Emiliani, S., Peloponese, J.-M., Jeang, K.-T., Coux, O., et al. (2003). A non-proteolytic role for ubiquitin in Tat-mediated transactivation of the HIV-1 promoter. *Nat. Cell Biol.* *5*, 754–761.
- Brown, C.J., Lain, S., Verma, C.S., Fersht, A.R., and Lane, D.P. (2009). Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 862–873.
- Bunch, H., Zheng, X., Burkholder, A., Dillon, S.T., Motola, S., Birrane, G., Ebmeier, C.C., Levine, S., Fargo, D., Hu, G., et al. (2014). TRIM28 regulates RNA polymerase II promoter-proximal pausing and pause release. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 876–883.
- Bürck, C., Mund, A., Berscheminski, J., Kieweg, L., Müncheberg, S., Dobner, T., and Schreiner, S. (2016). KAP1 Is a Host Restriction Factor That Promotes Human Adenovirus E1B-55K SUMO Modification. *J. Virol.* *90*, 930–946.
- Buzon, M.J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., Martin-Gayo, E., Leng, J., Henrich, T.J., Li, J.Z., et al. (2014). HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. *Nat. Med.* *20*, 139–142.
- Calcagno, A., Di Perri, G., and Bonora, S. (2017). Treating HIV Infection in the Central Nervous System. *Drugs* *77*, 145–157.
- Callen, B.P., Shearwin, K.E., and Egan, J.B. (2004). Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter. *Mol. Cell* *14*, 647–656.
- Campbell, E.M., Nunez, R., and Hope, T.J. (2004). Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J. Virol.* *78*, 5745–5755.
- Campbell, E.M., Perez, O., Anderson, J.L., and Hope, T.J. (2008). Visualization of a proteasome-independent intermediate during restriction of HIV-1 by rhesus TRIM5alpha. *J. Cell Biol.* *180*, 549–561.
- Canonne-Hergaux, F., Aunis, D., and Schaeffer, E. (1995). Interactions of the transcription factor AP-1 with the long terminal repeat of different human immunodeficiency virus type 1 strains in Jurkat, glial, and neuronal cells. *J. Virol.* *69*, 6634–6642.

- Cardarelli, F., Serresi, M., Albanese, A., Bizzarri, R., and Beltram, F. (2011). Quantitative Analysis of Tat Peptide Binding to Import Carriers Reveals Unconventional Nuclear Transport Properties. *J. Biol. Chem.* 286, 12292–12299.
- Carroll-Anzinger, D., and Al-Harhi, L. (2006). Gamma interferon primes productive human immunodeficiency virus infection in astrocytes. *J. Virol.* 80, 541–544.
- Carter, G.C., Bernstone, L., Baskaran, D., and James, W. (2011). HIV-1 infects macrophages by exploiting an endocytic route dependent on dynamin, Rac1 and Pak1. *Virology* 409, 234–250.
- Caskey, M., Klein, F., Lorenzi, J.C.C., Seaman, M.S., West, A.P., Buckley, N., Kremer, G., Nogueira, L., Braunschweig, M., Scheid, J.F., et al. (2015). Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature* 522, 487–491.
- Caskey, M., Schoofs, T., Gruell, H., Settler, A., Karagounis, T., Kreider, E.F., Murrell, B., Pfeifer, N., Nogueira, L., Oliveira, T.Y., et al. (2017). Antibody 10-1074 suppresses viremia in HIV-1-infected individuals. *Nat. Med.* 23, 185–191.
- Ceballos-Chávez, M., Rivero, S., García-Gutiérrez, P., Rodríguez-Paredes, M., García-Domínguez, M., Bhattacharya, S., and Reyes, J.C. (2012). Control of neuronal differentiation by sumoylation of BRAF35, a subunit of the LSD1-CoREST histone demethylase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 8085–8090.
- Centers for Disease Control (CDC) (1981). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 30, 305–308.
- Chan, C.N., Trinité, B., Lee, C.S., Mahajan, S., Anand, A., Wodarz, D., Sabbaj, S., Bansal, A., Goepfert, P.A., and Levy, D.N. (2016). HIV-1 latency and virus production from unintegrated genomes following direct infection of resting CD4 T cells. *Retrovirology* 13.
- Chang, P.-C., Fitzgerald, L.D., Van Geelen, A., Izumiya, Y., Ellison, T.J., Wang, D.-H., Ann, D.K., Luciw, P.A., and Kung, H.-J. (2009a). Kruppel-associated box domain-associated protein-1 as a latency regulator for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and its modulation by the viral protein kinase. *Cancer Res.* 69, 5681–5689.
- Chang, T.-H., Kubota, T., Matsuoka, M., Jones, S., Bradfute, S.B., Bray, M., and Ozato, K. (2009b). Ebola Zaire virus blocks type I interferon production by exploiting the host SUMO modification machinery. *PLoS Pathog.* 5, e1000493.
- Chauhan, A., Mehla, R., Vijayakumar, T.S., and Handy, I. (2014). Endocytosis-mediated HIV-1 entry and its significance in the elusive behavior of the virus in astrocytes. *Virology* 456–457, 1–19.
- Chekuri, A., Bhaskar, C., Bollimpelli, V.S., and Kondapi, A.K. (2016). TopoisomeraseII β in HIV-1 transactivation. *Arch. Biochem. Biophys.* 593, 90–97.
- Chen, H.-C., Martinez, J.P., Zorita, E., Meyerhans, A., and Fillion, G.J. (2017a). Position effects influence HIV latency reversal. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 47–54.
- Chen, N.C., Partridge, A.T., Sell, C., Torres, C., and Martín-García, J. (2017b). Fate of Microglia during HIV-1 Infection: From Activation to Senescence? *Glia* 65, 431–446.

- Chen, R., Le Rouzic, E., Kearney, J.A., Mansky, L.M., and Benichou, S. (2004). Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *J. Biol. Chem.* 279, 28419–28425.
- Chen, R., Liu, M., Li, H., Xue, Y., Ramey, W.N., He, N., Ai, N., Luo, H., Zhu, Y., Zhou, N., et al. (2008). PP2B and PP1 α cooperatively disrupt 7SK snRNP to release P-TEFb for transcription in response to Ca²⁺ signaling. *Genes Dev.* 22, 1356–1368.
- Chen, X.-Q., Liu, C., and Kong, X.-H. (2011). The role of HIV replicative fitness in perinatal transmission of HIV. *Viol. Sin.* 26, 147–155.
- du Chéné, I., Basyuk, E., Lin, Y.-L., Triboulet, R., Knezevich, A., Chable-Bessia, C., Mettling, C., Baillat, V., Reynes, J., Corbeau, P., et al. (2007). Suv39H1 and HP1gamma are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. *EMBO J.* 26, 424–435.
- Cheng, C.-T., Kuo, C.-Y., and Ann, D.K. (2014). KAPtain in charge of multiple missions: Emerging roles of KAP1. *World J. Biol. Chem.* 5, 308–320.
- 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.
- Cherrier, T., Suzanne, S., Redel, L., Calao, M., Marban, C., Samah, B., Mukerjee, R., Schwartz, C., Gras, G., Sawaya, B.E., et al. (2009). p21(WAF1) gene promoter is epigenetically silenced by CTIP2 and SUV39H1. *Oncogene* 28, 3380–3389.
- Cherrier, T., Le Douce, V., Eilebrecht, S., Riclet, R., Marban, C., Dequiedt, F., Goumon, Y., Paillart, J.-C., Mericskay, M., Parlakian, A., et al. (2013). CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12655–12660.
- Chikuma, S., Suita, N., Okazaki, I.-M., Shibayama, S., and Honjo, T. (2012). TRIM28 prevents autoinflammatory T cell development in vivo. *Nat. Immunol.* 13, 596–603.
- Cho, S., Schroeder, S., Kaehleke, K., Kwon, H.-S., Pedal, A., Herker, E., Schnoelzer, M., and Ott, M. (2009). Acetylation of cyclin T1 regulates the equilibrium between active and inactive P-TEFb in cells. *EMBO J.* 28, 1407.
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.-R., Ghattas, G., Brenchley, J.M., et al. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* 15, 893–900.
- Chun, R.F., Semmes, O.J., Neuveut, C., and Jeang, K.T. (1998a). Modulation of Sp1 phosphorylation by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J. Virol.* 72, 2615–2629.
- Chun, T.W., Engel, D., Berrey, M.M., Shea, T., Corey, L., and Fauci, A.S. (1998b). 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.
- Churcher, M.J., Lamont, C., Hamy, F., Dingwall, C., Green, S.M., Lowe, A.D., Butler, P.J.G., Gait, M.J., and Karn, J. (1993). High Affinity Binding of TAR RNA by the Human Immunodeficiency Virus Type-1 tat Protein Requires Base-pairs in the RNA Stem and Amino Acid Residues Flanking the Basic Region. *J. Mol. Biol.* 230, 90–110.

- Churchill, M.J., Cowley, D.J., Wesselingh, S.L., Gorry, P.R., and Gray, L.R. (2015). HIV-1 transcriptional regulation in the central nervous system and implications for HIV cure research. *J. Neurovirol.* *21*, 290–300.
- Chymkowitz, P., Nguéa P, A., and Enserink, J.M. (2015). SUMO-regulated transcription: challenging the dogma. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *37*, 1095–1105.
- Cihlar, T., and Fordyce, M. (2016). Current status and prospects of HIV treatment. *Curr. Opin. Virol.* *18*, 50–56.
- Cismasiu, V.B., Adamo, K., Gecewicz, J., Duque, J., Lin, Q., and Avram, D. (2005). BCL11B functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted promoter. *Oncogene* *24*, 6753–6764.
- Cismasiu, V.B., Paskaleva, E., Suman Daya, S., Canki, M., Duus, K., and Avram, D. (2008). BCL11B is a general transcriptional repressor of the HIV-1 long terminal repeat in T lymphocytes through recruitment of the NuRD complex. *Virology* *380*, 173–181.
- Cismasiu, V.B., Duque, J., Paskaleva, E., Califano, D., Ghanta, S., Young, H.A., and Avram, D. (2009). BCL11B enhances TCR/CD28-triggered NF- κ B activation through upregulation of Cot kinase gene expression in T lymphocytes. *Biochem. J.* *417*, 457–466.
- Citro, S., Jaffray, E., Hay, R.T., Seiser, C., and Chiocca, S. (2013). A role for paralog-specific sumoylation in histone deacetylase 1 stability. *J. Mol. Cell Biol.* *5*, 416–427.
- Clark, E., Nava, B., Caputi, M., Clark, E., Nava, B., and Caputi, M. (2017). Tat is a multifunctional viral protein that modulates cellular gene expression and functions. *Oncotarget* *5*.
- Clark, L., Matthews, J.R., and Hay, R.T. (1990). Interaction of enhancer-binding protein EBPI (NF-kappa B) with the human immunodeficiency virus type 1 enhancer. *J. Virol.* *64*, 1335–1344.
- Clements, J.E., Gama, L., Graham, D.R., Mankowski, J.L., and Zink, M.C. (2011). A simian immunodeficiency virus macaque model of highly active antiretroviral treatment: viral latency in the periphery and the central nervous system. *Curr. Opin. HIV AIDS* *6*, 37–42.
- Clever, J.L., and Parslow, T.G. (1997). Mutant human immunodeficiency virus type 1 genomes with defects in RNA dimerization or encapsidation. *J. Virol.* *71*, 3407–3414.
- Coffin, J.M. (1995). HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* *267*, 483–489.
- Cohen, Y.Z., and Caskey, M. (2018). Broadly neutralizing antibodies for treatment and prevention of HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS*.
- Cohen, M.S., Chen, Y.Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M.C., Kumarasamy, N., Hakim, J.G., Kumwenda, J., Grinsztejn, B., Pilotto, J.H.S., et al. (2016). Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. *N. Engl. J. Med.* *375*, 830–839.
- Coiras, M., Camafeita, E., Ureña, T., López, J.A., Caballero, F., Fernández, B., López-Huertas, M.R., Pérez-Olmeda, M., and Alcamí, J. (2006). Modifications in the human T cell proteome induced by intracellular HIV-1 Tat protein expression. *PROTEOMICS* *6*, S63–S73.

- Coiras, M., López-Huertas, M.R., Pérez-Olmeda, M., and Alcamí, J. (2009). Understanding HIV-1 latency provides clues for the eradication of long-term reservoirs. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 798–812.
- 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.
- Coleman, C.M., and Wu, L. (2009). HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology* 6, 51.
- Colin, L., and Van Lint, C. (2009a). Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology* 6, 111.
- Colin, L., and Van Lint, C. (2009b). Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology* 6, 111.
- Colin, L., Vandenhoudt, N., de Walque, S., Van Driessche, B., Bergamaschi, A., Martinelli, V., Cherrier, T., Vanhulle, C., Guiguen, A., David, A., et al. (2011). The AP-1 binding sites located in the pol gene intragenic regulatory region of HIV-1 are important for viral replication. *PLoS One* 6, e19084.
- Colomer-Lluch, M., and Serra-Moreno, R. (2017). BCA2/Rabring7 Interferes with HIV-1 Proviral Transcription by Enhancing the SUMOylation of I κ B α . *J. Virol.* 91.
- 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.
- Conrad, R.J., Fozouni, P., Thomas, S., Sy, H., Zhang, Q., Zhou, M.-M., and Ott, M. (2017). The Short Isoform of BRD4 Promotes HIV-1 Latency by Engaging Repressive SWI/SNF Chromatin-Remodeling Complexes. *Mol. Cell* 67, 1001-1012.e6.
- Contreras, X., Barboric, M., Lenasi, T., and Peterlin, B.M. (2007). HMBA Releases P-TEFb from HEXIM1 and 7SK snRNA via PI3K/Akt and Activates HIV Transcription. *PLoS Pathog.* 3.
- Cosnefroy, O., Murray, P.J., and Bishop, K.N. (2016). HIV-1 capsid uncoating initiates after the first strand transfer of reverse transcription. *Retrovirology* 13.
- Cron, R.Q., Bartz, S.R., Clausell, A., Bort, S.J., Klebanoff, S.J., and Lewis, D.B. (2000). NFAT1 enhances HIV-1 gene expression in primary human CD4 T cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 94, 179–191.
- Cuijpers, S.A.G., Willemstein, E., and Vertegaal, A.C.O. (2017). Converging Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) and Ubiquitin Signaling: Improved Methodology Identifies Co-modified Target Proteins. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 16, 2281–2295.
- Czerwińska, P., Mazurek, S., and Wiznerowicz, M. (2017). The complexity of TRIM28 contribution to cancer. *J. Biomed. Sci.* 24.
- Darcis, G., Kula, A., Bouchat, S., Fujinaga, K., Corazza, F., Ait-Ammar, A., Delacourt, N., Melard, A., Kabeya, K., Vanhulle, C., et al. (2015). An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various In Vitro and Ex Vivo HIV-1 Latency Models

- Identified Bryostatin-1+JQ1 and Ingenol-B+JQ1 to Potently Reactivate Viral Gene Expression. *PLoS Pathog.* *11*.
- Darcis, G., Van Driessche, B., and Van Lint, C. (2016). Preclinical shock strategies to reactivate latent HIV-1: an update. *Curr. Opin. HIV AIDS* *11*, 388–393.
- Darcis, G., Van Driessche, B., and Van Lint, C. (2017). HIV Latency: Should We Shock or Lock? *Trends Immunol.* *38*, 217–228.
- David, G., Neptune, M.A., and DePinho, R.A. (2002). SUMO-1 Modification of Histone Deacetylase 1 (HDAC1) Modulates Its Biological Activities. *J. Biol. Chem.* *277*, 23658–23663.
- De Rijck, J., and Debyser, Z. (2006). The central DNA flap of the human immunodeficiency virus type 1 is important for viral replication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *349*, 1100–1110.
- Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H., and Beaumelle, B. (2012). The Ins and Outs of HIV-1 Tat. *Traffic* *13*, 355–363.
- Delagrèverie, H.M., Delaugerre, C., Lewin, S.R., Deeks, S.G., and Li, J.Z. (2016). Ongoing Clinical Trials of Human Immunodeficiency Virus Latency-Reversing and Immunomodulatory Agents. *Open Forum Infect. Dis.* *3*, ofw189.
- Della Chiara, G., Crotti, A., Liboi, E., Giacca, M., Poli, G., and Lusic, M. (2011). Negative regulation of HIV-1 transcription by a heterodimeric NF- κ B1/p50 and C-terminally truncated STAT5 complex. *J. Mol. Biol.* *410*, 933–943.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., et al. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* *381*, 661–666.
- Descours, B., Petitjean, G., López-Zaragoza, J.-L., Bruel, T., Raffel, R., Psomas, C., Reynes, J., Lacabaratz, C., Levy, Y., Schwartz, O., et al. (2017). CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses. *Nature* *543*, 564–567.
- Desplats, P., Dumaop, W., Smith, D., Adame, A., Everall, I., Letendre, S., Ellis, R., Cherner, M., Grant, I., and Masliah, E. (2013). Molecular and pathologic insights from latent HIV-1 infection in the human brain. *Neurology* *80*, 1415–1423.
- Desterro, J.M., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T. (1998). SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. *Mol. Cell* *2*, 233–239.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., and Ozato, K. (2003). The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8758–8763.
- Dhall, A., Wei, S., Fierz, B., Woodcock, C.L., Lee, T.-H., and Chatterjee, C. (2014). Sumoylated Human Histone H4 Prevents Chromatin Compaction by Inhibiting Long-range Internucleosomal Interactions. *J. Biol. Chem.* *289*, 33827–33837.
- Díaz, L., Martínez-Bonet, M., Sánchez, J., Fernández-Pineda, A., Jiménez, J.L., Muñoz, E., Moreno, S., Álvarez, S., and Muñoz-Fernández, M.Á. (2015). Bryostatin activates HIV-1 latent expression in human astrocytes through a PKC and NF- κ B-dependent mechanism. *Sci. Rep.* *5*, 12442.

- Ding, D., Qu, X., Li, L., Zhou, X., Liu, S., Lin, S., Wang, P., Liu, S., Kong, C., Wang, X., et al. (2013). Involvement of histone methyltransferase GLP in HIV-1 latency through catalysis of H3K9 dimethylation. *Virology* 440, 182–189.
- Ding, D., Bergmaier, P., Sachs, P., Klangwart, M., Rückert, T., Bartels, N., Demmers, J., Dekker, M., Poot, R.A., and Mermoud, J.E. (2018). The CUE1 domain of the SNF2-like chromatin remodeler SMARCAD1 mediates its association with KRAB-associated protein 1 (KAP1) and KAP1 target genes. *J. Biol. Chem.* 293, 2711–2724.
- Domingues, P., Golebiowski, F., Tatham, M.H., Lopes, A.M., Taggart, A., Hay, R.T., and Hale, B.G. (2015). Global Reprogramming of Host SUMOylation during Influenza Virus Infection. *Cell Rep.* 13, 1467–1480.
- D’Orso, I., and Frankel, A.D. (2010a). RNA-mediated displacement of an inhibitory snRNP complex activates transcription elongation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 815–821.
- D’Orso, I., and Frankel, A.D. (2010b). RNA-mediated displacement of an inhibitory snRNP complex activates transcription elongation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 815–821.
- D’Orso, I., Jang, G.M., Pastuszak, A.W., Faust, T.B., Quezada, E., Booth, D.S., and Frankel, A.D. (2012). Transition Step during Assembly of HIV Tat:P-TEFb Transcription Complexes and Transfer to TAR RNA. *Mol. Cell. Biol.* 32, 4780–4793.
- Doyle, J.M., Gao, J., Wang, J., Yang, M., and Potts, P.R. (2010). MAGE-RING Protein Complexes Comprise a Family of E3 Ubiquitin Ligases. *Mol. Cell* 39, 963–974.
- Dreer, M., van de Poel, S., and Stubenrauch, F. (2017). Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8^{E2} protein. *Virus Res.* 231, 96–102.
- Dubuissez, M., Loison, I., Paget, S., Vorng, H., Ait-Yahia, S., Rohr, O., Tscicopoulos, A., and Leprince, D. (2016). Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of BCL11B at Serine 2 Negatively Regulates Its Interaction with NuRD Complexes during CD4⁺ T-Cell Activation. *Mol. Cell. Biol.* 36, 1881–1898.
- Duverger, A., Wolschendorf, F., Zhang, M., Wagner, F., Hatcher, B., Jones, J., Cron, R.Q., van der Sluis, R.M., Jeeninga, R.E., Berkhout, B., et al. (2013). An AP-1 binding site in the enhancer/core element of the HIV-1 promoter controls the ability of HIV-1 to establish latent infection. *J. Virol.* 87, 2264–2277.
- Easley, R., Duyne, R.V., Coley, W., Guendel, I., Dadgar, S., Kehn-Hall, K., and Kashanchi, F. (2010). Chromatin dynamics associated with HIV-1 Tat activated transcription. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 275.
- Eggink, D., Berkhout, B., and Sanders, R.W. (2010). Inhibition of HIV-1 by fusion inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 16, 3716–3728.
- Egloff, S., Van Herreweghe, E., and Kiss, T. (2006). Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding. *Mol. Cell. Biol.* 26, 630–642.
- Ehret, A., Li-Weber, M., Frank, R., and Krammer, P.H. (2001). The effect of HIV-1 regulatory proteins on cellular genes: derepression of the IL-2 promoter by Tat. *Eur. J. Immunol.* 31, 1790–1799.

- Eilebrecht, S., Le Douce, V., Riclet, R., Targat, B., Hallay, H., Van Driessche, B., Schwartz, C., Robette, G., Van Lint, C., Rohr, O., et al. (2014). HMG1A1 recruits CTIP2-repressed P-TEFb to the HIV-1 and cellular target promoters. *Nucleic Acids Res.* *42*, 4962–4971.
- Eisele, E., and Siliciano, R.F. (2012). Redefining the Viral Reservoirs That Prevent HIV-1 Eradication. *Immunity* *37*, 377–388.
- Elliott, J.H., McMahon, J.H., Chang, C.C., Lee, S.A., Hartogensis, W., Bumpus, N., Savic, R., Roney, J., Hoh, R., Solomon, A., et al. (2015). Short-term administration of disulfiram for reversal of latent HIV infection: a phase 2 dose-escalation study. *Lancet HIV* *2*, e520-529.
- Endo-Munoz, L., Warby, T., Harrich, D., and McMillan, N.A.J. (2005). Phosphorylation of HIV Tat by PKR increases interaction with TAR RNA and enhances transcription. *Viol. J.* *2*, 17.
- Engelman, A., Mizuuchi, K., and Craigie, R. (1991). HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* *67*, 1211–1221.
- Ensoli, B., Gendelman, R., Markham, P., Fiorelli, V., Colombini, S., Raffeld, M., Cafaro, A., Chang, H.K., Brady, J.N., and Gallo, R.C. (1994). Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature* *371*, 674–680.
- Ensoli, B., Nchabeleng, M., Ensoli, F., Tripiciano, A., Bellino, S., Picconi, O., Sgadari, C., Longo, O., Tivoschi, L., Joffe, D., et al. (2016). HIV-Tat immunization induces cross-clade neutralizing antibodies and CD4(+) T cell increases in antiretroviral-treated South African volunteers: a randomized phase II clinical trial. *Retrovirology* *13*, 34.
- Erker, Y., Neyret-Kahn, H., Seeler, J.S., Dejean, A., Atfi, A., and Levy, L. (2013). Arkadia, a novel SUMO-targeted ubiquitin ligase involved in PML degradation. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 2163–2177.
- Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., Robert-Hebmann, V., Gay, B., Varbanov, M., Codogno, P., and Biard-Piechaczyk, M. (2006). Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J. Clin. Invest.* *116*, 2161–2172.
- Espert, L., Varbanov, M., Robert-Hebmann, V., Sagnier, S., Robbins, I., Sanchez, F., Lafont, V., and Biard-Piechaczyk, M. (2009). Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. *PloS One* *4*, e5787.
- Everett, R.D., and Chelbi-Alix, M.K. (2007). PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* *89*, 819–830.
- Fanales-Belasio, E., Moretti, S., Nappi, F., Barillari, G., Micheletti, F., Cafaro, A., and Ensoli, B. (2002). Native HIV-1 Tat Protein Targets Monocyte-Derived Dendritic Cells and Enhances Their Maturation, Function, and Antigen-Specific T Cell Responses. *J. Immunol.* *168*, 197–206.
- Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B., and Buttò, S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann. Ist. Super. Sanita* *46*, 5–14.
- 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.

- Faust, T.B., Li, Y., Jang, G.M., Johnson, J.R., Yang, S., Weiss, A., Krogan, N.J., and Frankel, A.D. (2017). PJA2 ubiquitinates the HIV-1 Tat protein with atypical chain linkages to activate viral transcription. *Sci. Rep.* 7, 45394.
- Fehniger, T.A., Herbein, G., Yu, H., Para, M.I., Bernstein, Z.P., O'Brien, W.A., and Caligiuri, M.A. (1998). Natural Killer Cells from HIV-1+ Patients Produce C-C Chemokines and Inhibit HIV-1 Infection. *J. Immunol.* 161, 6433–6438.
- Feng, S., and Holland, E.C. (1988). HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* 334, 165–167.
- Flotho, A., and Melchior, F. (2013). Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 357–385.
- Ford, E.S., Puro, N., and Sereti, I. (2009). Immunopathogenesis of Asymptomatic Chronic HIV Infection: The Calm before the Storm. *Curr. Opin. HIV AIDS* 4, 206–214.
- Forshey, B.M., von Schwedler, U., Sundquist, W.I., and Aiken, C. (2002). Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J. Virol.* 76, 5667–5677.
- Frankel, A.D., and Young, J.A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 1–25.
- Frankel, A., Yadav, N., Lee, J., Branscombe, T.L., Clarke, S., and Bedford, M.T. (2002). The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 277, 3537–3543.
- Freed, E.O. (2015a). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 484–496.
- Freed, E.O. (2015b). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 484–496.
- Friedman, J., Cho, W.-K., Chu, C.K., Keedy, K.S., Archin, N.M., Margolis, D.M., and Karn, J. (2011). Epigenetic Silencing of HIV-1 by the Histone H3 Lysine 27 Methyltransferase Enhancer of Zeste 2^Δ. *J. Virol.* 85, 9078–9089.
- Frietze, S., O'Geen, H., Blahnik, K.R., Jin, V.X., and Farnham, P.J. (2010). ZNF274 Recruits the Histone Methyltransferase SETDB1 to the 3' Ends of ZNF Genes. *PLoS ONE* 5.
- Fritz, J.V., Didier, P., Clamme, J.-P., Schaub, E., Muriaux, D., Cabanne, C., Morellet, N., Bouaziz, S., Darlix, J.-L., Mély, Y., et al. (2008). Direct Vpr-Vpr interaction in cells monitored by two photon fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence lifetime imaging. *Retrovirology* 5, 87.
- Fujinaga, K., Irwin, D., Huang, Y., Taube, R., Kurosu, T., and Peterlin, B.M. (2004). Dynamics of Human Immunodeficiency Virus Transcription: P-TEFb Phosphorylates RD and Dissociates Negative Effectors from the Transactivation Response Element. *Mol. Cell. Biol.* 24, 787–795.
- Fujinaga, K., Barboric, M., Li, Q., Luo, Z., Price, D.H., and Peterlin, B.M. (2012). PKC phosphorylates HEXIM1 and regulates P-TEFb activity. *Nucleic Acids Res.* 40, 9160–9170.

- Fulcher, A.J., Sivakumaran, H., Jin, H., Rawle, D.J., Harrich, D., and Jans, D.A. (2016). The protein arginine methyltransferase PRMT6 inhibits HIV-1 Tat nucleolar retention. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1863*, 254–262.
- Funke, J., Dürr, R., Dietrich, U., and Koch, J. (2011). Natural killer cells in HIV-1 infection: a double-edged sword. *AIDS Rev.* *13*, 67–76.
- 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.
- Gallay, P., Stitt, V., Mundy, C., Oettinger, M., and Trono, D. (1996). Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J. Virol.* *70*, 1027–1032.
- 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.
- Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Redfield, R., Oleske, J., and Safai, B. (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* *224*, 500–503.
- Gandhi, N., Saiyed, Z., Thangavel, S., Rodriguez, J., Rao, K.V.K., and Nair, M.P.N. (2009). Differential effects of HIV type 1 clade B and clade C Tat protein on expression of proinflammatory and antiinflammatory cytokines by primary monocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *25*, 691–699.
- Ganser-Pornillos, B., Yeager, M., and Sundquist, W.I. (2008). The Structural Biology of HIV Assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *18*, 203.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., et al. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* *397*, 436–441.
- García-Martínez, L.F., Mavankal, G., Neveu, J.M., Lane, W.S., Ivanov, D., and Gaynor, R.B. (1997). Purification of a Tat-associated kinase reveals a TFIIF complex that modulates HIV-1 transcription. *EMBO J.* *16*, 2836–2850.
- Garden, G.A. (2002). Microglia in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *Glia* *40*, 240–251.
- Gargano, B., Fiorillo, M., Amente, S., Majello, B., and Lania, L. (2008). p14ARF is capable of promoting HIV-1 tat degradation. *Cell Cycle Georget. Tex* *7*, 1433–1439.
- Gärtner, A., and Muller, S. (2014). PML, SUMO, and RNF4: Guardians of Nuclear Protein Quality. *Mol. Cell* *55*, 1–3.
- Garvin, A.J., Densham, R.M., Blair-Reid, S.A., Pratt, K.M., Stone, H.R., Weekes, D., Lawrence, K.J., and Morris, J.R. (2013). The deSUMOylase SENP7 promotes chromatin relaxation for homologous recombination DNA repair. *EMBO Rep.* *14*, 975–983.
- Gautier, V.W., Gu, L., O'Donoghue, N., Pennington, S., Sheehy, N., and Hall, W.W. (2009). In vitro nuclear interactome of the HIV-1 Tat protein. *Retrovirology* *6*, 47.

- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., et al. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587–597.
- Ghezzi, S., Noonan, D.M., Aluigi, M.G., Vallanti, G., Cota, M., Benelli, R., Morini, M., Reeves, J.D., Vicenzi, E., Poli, G., et al. (2000). Inhibition of CXCR4-dependent HIV-1 infection by extracellular HIV-1 Tat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 992–996.
- Ghosh, A.K., Osswald, H.L., and Prato, G. (2016). Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS. *J. Med. Chem.* 59, 5172–5208.
- Gil, J., and O’Loughlen, A. (2014). PRC1 complex diversity: where is it taking us? *Trends Cell Biol.* 24, 632–641.
- Gilliam, B.L., Riedel, D.J., and Redfield, R.R. (2011). Clinical use of CCR5 inhibitors in HIV and beyond. *J. Transl. Med.* 9 *Suppl 1*, S9.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D., and Hay, R.T. (2003). p300 Transcriptional Repression Is Mediated by SUMO Modification. *Mol. Cell* 11, 1043–1054.
- Gjyshi, O., Roy, A., Dutta, S., Veettil, M.V., Dutta, D., and Chandran, B. (2015). Activated Nrf2 Interacts with Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Latency Protein LANA-1 and Host Protein KAP1 To Mediate Global Lytic Gene Repression. *J. Virol.* 89, 7874–7892.
- Goodarzi, A.A., Kurka, T., and Jeggo, P.A. (2011). KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 831–839.
- Götte, M., Li, X., and Wainberg, M.A. (1999). HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 199–210.
- Goujon, C., Moncorgé, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C.C., Schaller, T., Hué, S., Barclay, W.S., Schulz, R., and Malim, M.H. (2013). Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502, 559–562.
- Grabarczyk, P., Przybylski, G.K., Depke, M., Völker, U., Bahr, J., Assmus, K., Bröker, B.M., Walther, R., and Schmidt, C.A. (2007). Inhibition of BCL11B expression leads to apoptosis of malignant but not normal mature T cells. *Oncogene* 26, 3797–3810.
- Gray, R.H., Kigozi, G., Serwadda, D., Makumbi, F., Watya, S., Nalugoda, F., Kiwanuka, N., Moulton, L.H., Chaudhary, M.A., Chen, M.Z., et al. (2007). Male circumcision for HIV prevention in men in Rakai, Uganda: a randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* 369, 657–666.
- Groh, S., and Schotta, G. (2017). Silencing of endogenous retroviruses by heterochromatin. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 2055–2065.
- Groner, A.C., Meylan, S., Ciuffi, A., Zangger, N., Ambrosini, G., Dénervaud, N., Bucher, P., and Trono, D. (2010). KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS Genet.* 6, e1000869.

Guo, F., Cen, S., Niu, M., Javanbakht, H., and Kleiman, L. (2003). Specific Inhibition of the Synthesis of Human Lysyl-tRNA Synthetase Results in Decreases in tRNA^{Lys} Incorporation, Annealing to Viral RNA, and Viral Infectivity in Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 77, 9817–9822.

Gurer, C., Berthoux, L., and Luban, J. (2005). Covalent modification of human immunodeficiency virus type 1 p6 by SUMO-1. *J. Virol.* 79, 910–917.

Gürtler, L.G., Hauser, P.H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J.M., and Kaptue, L. (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol.* 68, 1581–1585.

Gutheil, W.G., Subramanyam, M., Flentke, G.R., Sanford, D.G., Munoz, E., Huber, B.T., and Bachovchin, W.W. (1994). Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6594–6598.

Gutierrez, S.E., and Romero-Oliva, F.A. (2013). Epigenetic changes: a common theme in acute myelogenous leukemogenesis. *J. Hematol. Oncol.* 6, 57.

Gutierrez, A., Kentsis, A., Sanda, T., Holmfeldt, L., Chen, S.-C., Zhang, J., Protopopov, A., Chin, L., Dahlberg, S.E., Neuberg, D.S., et al. (2011). The BCL11B tumor suppressor is mutated across the major molecular subtypes of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 118, 4169–4173.

Haas, A., Zimmermann, K., and Oxenius, A. (2011). Antigen-Dependent and -Independent Mechanisms of T and B Cell Hyperactivation during Chronic HIV-1 Infection. *J. Virol.* 85, 12102–12113.

Hakre, S., Chavez, L., Shirakawa, K., and Verdin, E. (2012). HIV latency: experimental systems and molecular models. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 706–716.

Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D., and Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360, 358–361.

Halper-Stromberg, A., Lu, C.-L., Klein, F., Horwitz, J.A., Bournazos, S., Nogueira, L., Eisenreich, T.R., Liu, C., Gazumyan, A., Schaefer, U., et al. (2014). Broadly Neutralizing Antibodies and Viral inducers decrease rebound from HIV-1 latent reservoirs in humanized mice. *Cell* 158, 989–999.

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.

Hare, S., Gupta, S.S., Valkov, E., Engelman, A., and Cherepanov, P. (2010). Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 464, 232–236.

- Hare, S., Maertens, G.N., and Cherepanov, P. (2012). 3'-processing and strand transfer catalysed by retroviral integrase in crystallo. *EMBO J.* *31*, 3020–3028.
- Harrich, D., Ulich, C., García-Martínez, L.F., and Gaynor, R.B. (1997). Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. *EMBO J.* *16*, 1224–1235.
- Harris, R.S., Hultquist, J.F., and Evans, D.T. (2012). The Restriction Factors of Human Immunodeficiency Virus. *J. Biol. Chem.* *287*, 40875–40883.
- Hauber, J., Malim, M.H., and Cullen, B.R. (1989). Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* *63*, 1181–1187.
- Hayashi, T., Jean, M., Huang, H., Simpson, S., Santoso, N.G., and Zhu, J. (2017). Screening of an FDA-approved compound library identifies levosimendan as a novel anti-HIV-1 agent that inhibits viral transcription. *Antiviral Res.* *146*, 76–85.
- 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, N., and Zhou, Q. (2011). New Insights into the Control of HIV-1 Transcription: When Tat Meets the 7SK snRNP and Super Elongation Complex (SEC). *J. Neuroimmune Pharmacol.* *6*, 260–268.
- He, N., Liu, M., Hsu, J., Xue, Y., Chou, S., Burlingame, A., Krogan, N.J., Alber, T., and Zhou, Q. (2010). HIV-1 Tat and Host AFF4 Recruit Two Transcription Elongation Factors into a Bifunctional Complex for Coordinated Activation of HIV-1 Transcription. *Mol. Cell* *38*, 428–438.
- He, N., Chan, C.K., Sobhian, B., Chou, S., Xue, Y., Liu, M., Alber, T., Benkirane, M., and Zhou, Q. (2011). Human Polymerase-Associated Factor complex (PAFc) connects the Super Elongation Complex (SEC) to RNA polymerase II on chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, E636-645.
- Hecker, C.-M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., and Dikic, I. (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J. Biol. Chem.* *281*, 16117–16127.
- Henderson, B.R., and Percipalle, P. (1997). Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J. Mol. Biol.* *274*, 693–707.
- Henderson, L.E., Sowder, R.C., Copeland, T.D., Oroszlan, S., and Benveniste, R.E. (1990). Gag precursors of HIV and SIV are cleaved into six proteins found in the mature virions. *J. Med. Primatol.* *19*, 411–419.
- Hendriks, I.A., Schimmel, J., Eifler, K., Olsen, J.V., and Vertegaal, A.C.O. (2015). Ubiquitin-specific Protease 11 (USP11) Deubiquitinates Hybrid Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)-Ubiquitin Chains to Counteract RING Finger Protein 4 (RNF4). *J. Biol. Chem.* *290*, 15526–15537.
- Henrich, T.J., Hu, Z., Li, J.Z., Sciaranghella, G., Busch, M.P., Keating, S.M., Gallien, S., Lin, N.H., Giguel, F.F., Lavoie, L., et al. (2013). Long-term reduction in peripheral blood HIV type

- 1 reservoirs following reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *J. Infect. Dis.* 207, 1694–1702.
- Herbein, G. (2016). TNF and HIV-1 Nef: An Intimate Interplay. *EBioMedicine* 13, 25–26.
- Herbein, G., and Khan, K.A. (2008). Is HIV infection a TNF receptor signalling-driven disease? *Trends Immunol.* 29, 61–67.
- Hickey, C.M., Wilson, N.R., and Hochstrasser, M. (2012). Function and Regulation of SUMO Proteases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 755–766.
- Hill, M., Tachedjian, G., and Mak, J. (2005a). The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr. HIV Res.* 3, 73–85.
- Hill, M., Tachedjian, G., and Mak, J. (2005b). The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr. HIV Res.* 3, 73–85.
- Hladik, F., and McElrath, M.J. (2008). Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 447–457.
- Hong, S., and Banks, W.A. (2015). Role of the Immune System in HIV-associated Neuroinflammation and Neurocognitive Implications. *Brain. Behav. Immun.* 0, 1–12.
- Hong, H.-W., Lee, S.-W., and Myung, H. (2013). Induced degradation of Tat by nucleocapsid (NC) via the proteasome pathway and its effect on HIV transcription. *Viruses* 5, 1143–1152.
- Houzet, L., Matusali, G., and Dejuq-Rainsford, N. (2014). Origins of HIV-infected leukocytes and virions in semen. *J. Infect. Dis.* 210 Suppl 3, S622–630.
- Howcroft, T.K., Strebel, K., Martin, M.A., and Singer, D.S. (1993). Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science* 260, 1320–1322.
- Hu, W.-S., and Hughes, S.H. (2012). HIV-1 Reverse Transcription. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
- Hu, C., Zhang, S., Gao, X., Gao, X., Xu, X., Lv, Y., Zhang, Y., Zhu, Z., Zhang, C., Li, Q., et al. (2012). Roles of Kruppel-associated Box (KRAB)-associated Co-repressor KAP1 Ser-473 Phosphorylation in DNA Damage Response. *J. Biol. Chem.* 287, 18937–18952.
- Hu, X., Lu, X., Liu, R., Ai, N., Cao, Z., Li, Y., Liu, J., Yu, B., Liu, K., Wang, H., et al. (2014). Histone cross-talk connects protein phosphatase 1 α (PP1 α) and histone deacetylase (HDAC) pathways to regulate the functional transition of bromodomain-containing 4 (BRD4) for inducible gene expression. *J. Biol. Chem.* 289, 23154–23167.
- Huang, T.T., Wuerzberger-Davis, S.M., Wu, Z.-H., and Miyamoto, S. (2003). Sequential modification of NEMO/IKK γ by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF- κ B activation by genotoxic stress. *Cell* 115, 565–576.
- Hübner, W., McNerney, G.P., Chen, P., Dale, B.M., Gordon, R.E., Chuang, F.Y.S., Li, X.-D., Asmuth, D.M., Huser, T., and Chen, B.K. (2009). Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses. *Science* 323, 1743–1747.
- Hughes, S.H. (2015). Reverse Transcription of Retroviruses and LTR Retrotransposons. *Microbiol. Spectr.* 3.

- Huo, L., Li, D., Sun, L., Liu, M., Shi, X., Sun, X., Li, J., Dong, B., Dong, X., and Zhou, J. (2011). Tat acetylation regulates its actions on microtubule dynamics and apoptosis in T lymphocytes. *J. Pathol.* 223, 28–36.
- Imai, K., Asamitsu, K., Victoriano, A.F.B., Cueno, M.E., Fujinaga, K., and Okamoto, T. (2009). Cyclin T1 stabilizes expression levels of HIV-1 Tat in cells. *FEBS J.* 276, 7124–7133.
- Imai, K., Togami, H., and Okamoto, T. (2010). Involvement of histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294. *J. Biol. Chem.* 285, 16538–16545.
- Imran, M., Manzoor, S., Saalim, M., Resham, S., Ashraf, J., Javed, A., and Waqar, A.B. (2016). HIV-1 and hijacking of the host immune system: the current scenario. *APMIS* 124, 817–831.
- Ismail, I.H., Gagné, J.-P., Caron, M.-C., McDonald, D., Xu, Z., Masson, J.-Y., Poirier, G.G., and Hendzel, M.J. (2012). CBX4-mediated SUMO modification regulates BMI1 recruitment at sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 40, 5497–5510.
- Ivanov, A.V., Peng, H., Yurchenko, V., Yap, K.L., Negorev, D.G., Schultz, D.C., Psulkowski, E., Fredericks, W.J., White, D.E., Maul, G.G., et al. (2007). PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol. Cell* 28, 823–837.
- Ivanov, D., Kwak, Y.T., Nee, E., Guo, J., García-Martínez, L.F., and Gaynor, R.B. (1999). Cyclin T1 domains involved in complex formation with Tat and TAR RNA are critical for tat-activation. *J. Mol. Biol.* 288, 41–56.
- Ivanov, D., Kwak, Y.T., Guo, J., and Gaynor, R.B. (2000). Domains in the SPT5 protein that modulate its transcriptional regulatory properties. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2970–2983.
- Iyengar, S., and Farnham, P.J. (2011). KAP1 Protein: An Enigmatic Master Regulator of the Genome. *J. Biol. Chem.* 286, 26267–26276.
- Iyengar, S., Ivanov, A.V., Jin, V.X., Rauscher, F.J., and Farnham, P.J. (2011). Functional analysis of KAP1 genomic recruitment. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1833–1847.
- Jaber, T., Bohl, C.R., Lewis, G.L., Wood, C., West, J.T., and Weldon, R.A. (2009). Human Ubc9 contributes to production of fully infectious human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.* 83, 10448–10459.
- Jacotot, E., Ferri, K.F., Hamel, C.E., Brenner, C., Druillennec, S., Hoebeke, J., Rustin, P., Métivier, D., Lenoir, C., Geuskens, M., et al. (2001). Control of Mitochondrial Membrane Permeabilization by Adenine Nucleotide Translocator Interacting with HIV-1 Viral Protein R and Bcl-2. *J. Exp. Med.* 193, 509.
- Jadlowsky, J.K., Nojima, M., Schulte, A., Geyer, M., Okamoto, T., and Fujinaga, K. (2008). Dominant negative mutant Cyclin T1 proteins inhibit HIV transcription by specifically degrading Tat. *Retrovirology* 5, 63.
- Jadlowsky, J.K., Wong, J.Y., Graham, A.C., Dobrowolski, C., Devor, R.L., Adams, M.D., Fujinaga, K., and Karn, J. (2014). Negative Elongation Factor Is Required for the Maintenance of Proviral Latency but Does Not Induce Promoter-Proximal Pausing of RNA Polymerase II on the HIV Long Terminal Repeat. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1911–1928.

- Janabi, N., Peudener, S., Héron, B., Ng, K.H., and Tardieu, M. (1995). Establishment of human microglial cell lines after transfection of primary cultures of embryonic microglial cells with the SV40 large T antigen. *Neurosci. Lett.* *195*, 105–108.
- Jarboui, M.A., Bidoia, C., Woods, E., Roe, B., Wynne, K., Elia, G., Hall, W.W., and Gautier, V.W. (2012). Nucleolar Protein Trafficking in Response to HIV-1 Tat: Rewiring the Nucleolus. *PLOS ONE* *7*, e48702.
- Jean, M.J., Hayashi, T., Huang, H., Brennan, J., Simpson, S., Purmal, A., Gurova, K., Keefer, M.C., Kobie, J.J., Santoso, N.G., et al. (2017). Curaxin CBL0100 Blocks HIV-1 Replication and Reactivation through Inhibition of Viral Transcriptional Elongation. *Front. Microbiol.* *8*, 2007.
- Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Li, Q., Chua, G., Poitras, C., Thérien, C., Bergeron, D., Bourassa, S., Greenblatt, J., et al. (2007). Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol. Cell* *27*, 262–274.
- Jiang, G., and Dandekar, S. (2015). Targeting NF- κ B signaling with protein kinase C agonists as an emerging strategy for combating HIV latency. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *31*, 4–12.
- Jiang, G., Espeseth, A., Hazuda, D.J., and Margolis, D.M. (2007). c-Myc and Sp1 contribute to proviral latency by recruiting histone deacetylase 1 to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J. Virol.* *81*, 10914–10923.
- Jiang, M., Mak, J., Ladha, A., Cohen, E., Klein, M., Rovinski, B., and Kleiman, L. (1993). Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* *67*, 3246–3253.
- Jin, X., Pan, Y., Wang, L., Zhang, L., Ravichandran, R., Potts, P.R., Jiang, J., Wu, H., and Huang, H. (2017). MAGE-TRIM28 complex promotes the Warburg effect and hepatocellular carcinoma progression by targeting FBP1 for degradation. *Oncogenesis* *6*, e312.
- Jones, G., and Power, C. (2006). Regulation of neural cell survival by HIV-1 infection. *Neurobiol. Dis.* *21*, 1–17.
- Joseph, S.B., Arrildt, K.T., Sturdevant, C.B., and Swanstrom, R. (2015). HIV-1 target cells in the CNS. *J. Neurovirol.* *21*, 276–289.
- Kabba, J.A., Xu, Y., Christian, H., Ruan, W., Chenai, K., Xiang, Y., Zhang, L., Saavedra, J.M., and Pang, T. (2018). Microglia: Housekeeper of the Central Nervous System. *Cell. Mol. Neurobiol.* *38*, 53–71.
- Kadoch, C., Hargreaves, D.C., Hodges, C., Elias, L., Ho, L., Ranish, J., and Crabtree, G.R. (2013). Proteomic and Bioinformatic Analysis of mSWI/SNF (BAF) Complexes Reveals Extensive Roles in Human Malignancy. *Nat. Genet.* *45*, 592–601.
- Kaehlecke, 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.
- Kahle, T., Volkmann, B., Eissmann, K., Herrmann, A., Schmitt, S., Wittmann, S., Merkel, L., Reuter, N., Stamminger, T., and Gramberg, T. (2015). TRIM19/PML Restricts HIV Infection in a Cell Type-Dependent Manner. *Viruses* *8*.

- Kalantari, P., Narayan, V., Henderson, A.J., and Prabhu, K.S. (2009). 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits HIV-1 transactivating protein, Tat, through covalent modification. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *23*, 2366–2373.
- Kalb, R., Latwiel, S., Baymaz, H.I., Jansen, P.W.T.C., Müller, C.W., Vermeulen, M., and Müller, J. (2014). Histone H2A monoubiquitination promotes histone H3 methylation in Polycomb repression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 569–571.
- Kameoka, M., Morgan, M., Binette, M., Russell, R.S., Rong, L., Guo, X., Mouland, A., Kleiman, L., Liang, C., and Wainberg, M.A. (2002). The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can promote placement of tRNA primer onto viral RNA and suppress later DNA polymerization in HIV-1 reverse transcription. *J. Virol.* *76*, 3637–3645.
- Kaminski, R., Chen, Y., Fischer, T., Tedaldi, E., Napoli, A., Zhang, Y., Karn, J., Hu, W., and Khalili, K. (2016). Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Sci. Rep.* *6*, 22555.
- Kamitani, S., Togi, S., Ikeda, O., Nakasuji, M., Sakauchi, A., Sekine, Y., Muromoto, R., Oritani, K., and Matsuda, T. (2011). Krüppel-associated box-associated protein 1 negatively regulates TNF- α -induced NF- κ B transcriptional activity by influencing the interactions among STAT3, p300, and NF- κ B/p65. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 2476–2483.
- Kandathil, A.J., Sugawara, S., and Balagopal, A. (2016). Are T cells the only HIV-1 reservoir? *Retrovirology* *13*.
- Kantor, B., Ma, H., Webster-Cyriaque, J., Monahan, P.E., and Kafri, T. (2009). Epigenetic activation of unintegrated HIV-1 genomes by gut-associated short chain fatty acids and its implications for HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18786–18791.
- Karlsson Hedestam, G.B., Fouchier, R.A.M., Phogat, S., Burton, D.R., Sodroski, J., and Wyatt, R.T. (2008). The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 143–155.
- Karn, J., and Stoltzfus, C.M. (2012). Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*.
- Kauder, S.E., Bosque, A., Lindqvist, A., Planelles, V., and Verdin, E. (2009). Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathog.* *5*, e1000495.
- Kazazi, F., Mathijs, J.M., Foley, P., and Cunningham, A.L. (1989). Variations in CD4 expression by human monocytes and macrophages and their relationships to infection with the human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* *70 (Pt 10)*, 2661–2672.
- Kedzierska, K., Azzam, R., Ellery, P., Mak, J., Jaworowski, A., and Crowe, S.M. (2003). Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* *26*, 247–263.
- Keele, B.F., Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L.V., Liegeois, F., et al. (2006). Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV-1. *Science* *313*, 523–526.

- Kessing, C.F., Nixon, C.C., Li, C., Tsai, P., Takata, H., Mousseau, G., Ho, P.T., Honeycutt, J.B., Fallahi, M., Trautmann, L., et al. (2017). In Vivo Suppression of HIV Rebound by Didehydro-Cortistatin A, a “Block-and-Lock” Strategy for HIV-1 Treatment. *Cell Rep.* *21*, 600–611.
- Kiernan, R.E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K.T., et al. (1999). HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J.* *18*, 6106–6118.
- Kilareski, E.M., Shah, S., Nonnemacher, M.R., and Wigdahl, B. (2009). Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* *6*, 118.
- Kim, H., Choi, M.-S., Inn, K.-S., and Kim, B.-J. (2016). Inhibition of HIV-1 reactivation by a telomerase-derived peptide in a HSP90-dependent manner. *Sci. Rep.* *6*, 28896.
- Kim, H.-Y., Choi, B.-S., Kim, S.S., Roh, T.-Y., Park, J., and Yoon, C.-H. (2014). NUCKS1, a novel Tat coactivator, plays a crucial role in HIV-1 replication by increasing Tat-mediated viral transcription on the HIV-1 LTR promoter. *Retrovirology* *11*.
- Kim, K.-C., Lee, S., Son, J., Shin, Y., Yoon, C.-H., Kang, C., and Choi, B.-S. (2017). Identification of novel genes associated with HIV-1 latency by analysis of histone modifications. *Hum. Genomics* *11*.
- Kim, Y.K., Bourgeois, C.F., Pearson, R., Tyagi, M., West, M.J., Wong, J., Wu, S.-Y., Chiang, C.-M., and Karn, J. (2006). Recruitment of TFIIH to the HIV LTR is a rate-limiting step in the emergence of HIV from latency. *EMBO J.* *25*, 3596–3604.
- King, C.A., Li, X., Barbachano-Guerrero, A., and Bhaduri-McIntosh, S. (2015). STAT3 Regulates Lytic Activation of Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus. *J. Virol.* *89*, 11347–11355.
- Klase, Z., Kale, P., Winograd, R., Gupta, M.V., Heydarian, M., Berro, R., McCaffrey, T., and Kashanchi, F. (2007). HIV-1 TAR element is processed by Dicer to yield a viral micro-RNA involved in chromatin remodeling of the viral LTR. *BMC Mol. Biol.* *8*, 63.
- Knoener, R.A., Becker, J.T., Scalf, M., Sherer, N.M., and Smith, L.M. (2017). Elucidating the in vivo interactome of HIV-1 RNA by hybridization capture and mass spectrometry. *Sci. Rep.* *7*, 16965.
- Köller, H., Schaal, H., Freund, M., Garrido, S.R., von Giesen, H.J., Ott, M., Rosenbaum, C., and Arendt, G. (2001). HIV-1 protein Tat reduces the glutamate-induced intracellular Ca²⁺ increase in cultured cortical astrocytes. *Eur. J. Neurosci.* *14*, 1793–1799.
- KOMINAMI, R. (2012). Role of the transcription factor Bcl11b in development and lymphomagenesis. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* *88*, 72–87.
- Kramer-Hämmerle, S., Rothenaigner, I., Wolff, H., Bell, J.E., and Brack-Werner, R. (2005). Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus. *Virus Res.* *111*, 194–213.
- Krueger, B.J., Varzavand, K., Cooper, J.J., and Price, D.H. (2010). The mechanism of release of P-TEFb and HEXIM1 from the 7SK snRNP by viral and cellular activators includes a conformational change in 7SK. *PLoS One* *5*, e12335.

- Kubota, S., Fukumoto, Y., Aoyama, K., Ishibashi, K., Yuki, R., Morinaga, T., Honda, T., Yamaguchi, N., Kuga, T., Tomonaga, T., et al. (2013). Phosphorylation of KRAB-associated protein 1 (KAP1) at Tyr-449, Tyr-458, and Tyr-517 by nuclear tyrosine kinases inhibits the association of KAP1 and heterochromatin protein 1 α (HP1 α) with heterochromatin. *J. Biol. Chem.* 288, 17871–17883.
- Kula, A., Gharu, L., and Marcello, A. (2013). HIV-1 pre-mRNA commitment to Rev mediated export through PSF and Matr3. *Virology* 435, 329–340.
- Kumar, A., and Herbein, G. (2014). The macrophage: a therapeutic target in HIV-1 infection. *Mol. Cell. Ther.* 2, 10.
- Kumar, A., and Zhang, K.Y.J. (2015). Advances in the development of SUMO specific protease (SEN) inhibitors. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13, 204–211.
- Kumar, A., Abbas, W., and Herbein, G. (2014). HIV-1 latency in monocytes/macrophages. *Viruses* 6, 1837–1860.
- Kumar, A., Darcis, G., Lint, C.V., and Herbein, G. (2015). Epigenetic control of HIV-1 post integration latency: implications for therapy. *Clin. Epigenetics* 7.
- Kumar, A., Abbas, W., Colin, L., Khan, K.A., Bouchat, S., Varin, A., Larbi, A., Gatot, J.-S., Kabeya, K., Vanhulle, C., et al. (2016). Tuning of AKT-pathway by Nef and its blockade by protease inhibitors results in limited recovery in latently HIV infected T-cell line. *Sci. Rep.* 6, 24090.
- Kuo, C.-Y., Li, X., Kong, X.-Q., Luo, C., Chang, C.-C., Chung, Y., Shih, H.-M., Li, K.K., and Ann, D.K. (2014). An Arginine-rich Motif of Ring Finger Protein 4 (RNF4) Oversees the Recruitment and Degradation of the Phosphorylated and SUMOylated Krüppel-associated Box Domain-associated Protein 1 (KAP1)/TRIM28 Protein during Genotoxic Stress. *J. Biol. Chem.* 289, 20757–20772.
- Kuppuswamy, M., Subramanian, T., Srinivasan, A., and Chinnadurai, G. (1989). Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res.* 17, 3551.
- Kutluay, S.B., Perez-Caballero, D., and Bieniasz, P.D. (2013). Fates of retroviral core components during unrestricted and TRIM5-restricted infection. *PLoS Pathog.* 9, e1003214.
- Lackner, A.A., Mohan, M., and Veazey, R.S. (2009). The gastrointestinal tract and AIDS pathogenesis. *Gastroenterology* 136, 1965–1978.
- Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* 13, 223–228.
- Lai, I.-L., Lin, T.-P., Yao, Y.-L., Lin, C.-Y., Hsieh, M.-J., and Yang, W.-M. (2010). Histone deacetylase 10 relieves repression on the melanogenic program by maintaining the deacetylation status of repressors. *J. Biol. Chem.* 285, 7187–7196.
- Larkin, M., Childs, R.A., Matthews, T.J., Thiel, S., Mizuochi, T., Lawson, A.M., Savill, J.S., Haslett, C., Diaz, R., and Feizi, T. (1989). Oligosaccharide-mediated interactions of the

- envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *AIDS Lond. Engl.* *3*, 793–798.
- Lassen, K.G., Ramyar, K.X., Bailey, J.R., Zhou, Y., and Siliciano, R.F. (2006). Nuclear retention of multiply spliced HIV-1 RNA in resting CD4+ T cells. *PLoS Pathog.* *2*, e68.
- Laughrea, M., Jetté, L., Mak, J., Kleiman, L., Liang, C., and Wainberg, M.A. (1997). Mutations in the kissing-loop hairpin of human immunodeficiency virus type 1 reduce viral infectivity as well as genomic RNA packaging and dimerization. *J. Virol.* *71*, 3397–3406.
- Le Douce, V., Colin, L., Redel, L., Cherrier, T., Herbein, G., Aunis, D., Rohr, O., Van Lint, C., and Schwartz, C. (2012). LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing. *Nucleic Acids Res.* *40*, 1904–1915.
- Le Douce, V., Cherrier, T., Riclet, R., Rohr, O., and Schwartz, C. (2014a). [CTIP2, a multifunctional protein: cellular physiopathology and therapeutic implications]. *Médecine Sci. MS* *30*, 797–802.
- Le Douce, V., Cherrier, T., Riclet, R., Rohr, O., and Schwartz, C. (2014b). The Many Lives of CTIP2: From AIDS to Cancer and Cardiac Hypertrophy. *J. Cell. Physiol.* *229*, 533–537.
- Le Douce, V., Forouzanfar, F., Eilebrecht, S., Van Driessche, B., Ait-Ammar, A., Verdikt, R., Kurashige, Y., Marban, C., Gautier, V., Candolfi, E., et al. (2016). HIC1 controls cellular- and HIV-1- gene transcription via interactions with CTIP2 and HMGA1. *Sci. Rep.* *6*, 34920.
- Le Rouzic, E., Mousnier, A., Rustum, C., Stutz, F., Hallberg, E., Dargemont, C., and Benichou, S. (2002). Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J. Biol. Chem.* *277*, 45091–45098.
- Lechner, M.S., Begg, G.E., Speicher, D.W., and Rauscher, F.J. (2000). Molecular Determinants for Targeting Heterochromatin Protein 1-Mediated Gene Silencing: Direct Chromoshadow Domain–KAP-1 Corepressor Interaction Is Essential. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 6449–6465.
- Lee, M.S., and Craigie, R. (1994). Protection of retroviral DNA from autointegration: involvement of a cellular factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 9823–9827.
- Lee, A., Cingöz, O., Sabo, Y., and Goff, S.P. (2018). Characterization of interaction between Trim28 and YY1 in silencing proviral DNA of Moloney murine leukemia virus. *Virology* *516*, 165–175.
- Lee, Y.-K., Thomas, S.N., Yang, A.J., and Ann, D.K. (2007a). Doxorubicin Down-regulates Krüppel-associated Box Domain-associated Protein 1 Sumoylation That Relieves Its Transcription Repression on p21WAF1/CIP1 in Breast Cancer MCF-7 Cells. *J. Biol. Chem.* *282*, 1595–1606.
- Lee, Y.-K., Thomas, S.N., Yang, A.J., and Ann, D.K. (2007b). Doxorubicin down-regulates Kruppel-associated box domain-associated protein 1 sumoylation that relieves its transcription repression on p21WAF1/CIP1 in breast cancer MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* *282*, 1595–1606.
- Lennon, M.J., Jones, S.P., Lovelace, M.D., Guillemin, G.J., and Brew, B.J. (2017). Bcl11b—A Critical Neurodevelopmental Transcription Factor—Roles in Health and Disease. *Front. Cell. Neurosci.* *11*.

- Lerner, P., Guadalupe, M., Donovan, R., Hung, J., Flamm, J., Prindiville, T., Sankaran-Walters, S., Syvanen, M., Wong, J.K., George, M.D., et al. (2011). The gut mucosal viral reservoir in HIV-infected patients is not the major source of rebound plasma viremia following interruption of highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* *85*, 4772–4782.
- Leth, S., Schleimann, M.H., Nissen, S.K., Højen, J.F., Olesen, R., Graversen, M.E., Jørgensen, S., Kjær, A.S., Denton, P.W., Mørk, A., et al. (2016). Combined effect of Vacc-4x, recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor vaccination, and romidepsin on the HIV-1 reservoir (REDUC): a single-arm, phase 1B/2A trial. *Lancet HIV* *3*, e463-472.
- Li, Y.P. (1997). Protein B23 is an important human factor for the nucleolar localization of the human immunodeficiency virus protein Tat. *J. Virol.* *71*, 4098–4102.
- Li, B., Zhou, J., Liu, P., Hu, J., Jin, H., Shimono, Y., Takahashi, M., and Xu, G. (2007a). Polycomb protein Cbx4 promotes SUMO modification of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *Biochem. J.* *405*, 369–378.
- Li, G.-H., Henderson, L., and Nath, A. (2016a). Astrocytes as an HIV Reservoir: Mechanism of HIV Infection. *Curr. HIV Res.* *14*, 373–381.
- Li, J., Chen, C., Ma, X., Geng, G., Liu, B., Zhang, Y., Zhang, S., Zhong, F., Liu, C., Yin, Y., et al. (2016b). Long noncoding RNA NRON contributes to HIV-1 latency by specifically inducing tat protein degradation. *Nat. Commun.* *7*.
- Li, L., Li, H.S., Pauza, C.D., Bukrinsky, M., and Zhao, R.Y. (2005a). Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res.* *15*, 923–934.
- Li, L., Dahiya, S., Kortagere, S., Aiamkitsumrit, B., Cunningham, D., Pirrone, V., Nonnemacher, M.R., and Wigdahl, B. (2012a). Impact of Tat Genetic Variation on HIV-1 Disease. *Adv. Virol.* *2012*, 123605.
- Li, P., Burke, S., Wang, J., Chen, X., Ortiz, M., Lee, S.-C., Lu, D., Campos, L., Goulding, D., Ng, B.L., et al. (2010). Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science* *329*, 85–89.
- Li, Q., Price, J.P., Byers, S.A., Cheng, D., Peng, J., and Price, D.H. (2005b). Analysis of the Large Inactive P-TEFb Complex Indicates That It Contains One 7SK Molecule, a Dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and Two P-TEFb Molecules Containing Cdk9 Phosphorylated at Threonine 186. *J. Biol. Chem.* *280*, 28819–28826.
- Li, X., Lee, Y.-K., Jeng, J.-C., Yen, Y., Schultz, D.C., Shih, H.-M., and Ann, D.K. (2007b). Role for KAP1 Serine 824 Phosphorylation and Sumoylation/Desumoylation Switch in Regulating KAP1-mediated Transcriptional Repression. *J. Biol. Chem.* *282*, 36177–36189.
- Li, X., Burton, E.M., and Bhaduri-McIntosh, S. (2017). Chloroquine triggers Epstein-Barr virus replication through phosphorylation of KAP1/TRIM28 in Burkitt lymphoma cells. *PLoS Pathog.* *13*, e1006249.
- Li, Z., Wu, S., Wang, J., Li, W., Lin, Y., Ji, C., Xue, J., and Chen, J. (2012b). Evaluation of the interactions of HIV-1 integrase with small ubiquitin-like modifiers and their conjugation enzyme Ubc9. *Int. J. Mol. Med.* *30*, 1053–1060.

- Li, Z., Mbonye, U., Feng, Z., Wang, X., Gao, X., Karn, J., and Zhou, Q. (2018). The KAT5-Acetyl-Histone4-Brd4 axis silences HIV-1 transcription and promotes viral latency. *PLoS Pathog.* *14*, e1007012.
- Liang, Q., Deng, H., Li, X., Wu, X., Tang, Q., Chang, T.-H., Peng, H., Rauscher, F.J., Ozato, K., and Zhu, F. (2011). Tripartite motif-containing protein 28 is a small ubiquitin-related modifier E3 ligase and negative regulator of IFN regulatory factor 7. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 4754–4763.
- Licciardello, M.P., and Kubicek, S. (2016). Pharmacological treats for SUMO addicts. *Pharmacol. Res.* *107*, 390–397.
- Lichinchi, G., Gao, S., Saletore, Y., Gonzalez, G.M., Bansal, V., Wang, Y., Mason, C.E., and Rana, T.M. (2016). Dynamics of the human and viral m(6)A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nat. Microbiol.* *1*, 16011.
- Lin, Y.-H., Yuan, J., Pei, H., Liu, T., Ann, D.K., and Lou, Z. (2015). KAP1 Deacetylation by SIRT1 Promotes Non-Homologous End-Joining Repair. *PLoS ONE* *10*.
- Liu, B., Tahk, S., Yee, K.M., Fan, G., and Shuai, K. (2010). The ligase PIAS1 restricts natural regulatory T cell differentiation by epigenetic repression. *Science* *330*, 521–525.
- Liu, H., Xu, E., Liu, J., and Xiong, H. (2016). Oligodendrocyte Injury and Pathogenesis of HIV-1-Associated Neurocognitive Disorders. *Brain Sci.* *6*.
- Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A., and Landau, N.R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* *86*, 367–377.
- Liu, R., Huang, L., Li, J., Zhou, X., Zhang, H., Zhang, T., Lei, Y., Wang, K., Xie, N., Zheng, Y., et al. (2013). HIV Infection in gastric epithelial cells. *J. Infect. Dis.* *208*, 1221–1230.
- Liu, Y., Jones, M., Hingtgen, C.M., Bu, G., Laribee, N., Tanzi, R.E., Moir, R.D., Nath, A., and He, J.J. (2000). Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat. Med.* *6*, 1380–1387.
- Llano, M., Delgado, S., Vanegas, M., and Poeschla, E.M. (2004). Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase. *J. Biol. Chem.* *279*, 55570–55577.
- Lokeswara Balakrishna, S., Satyanarayana, N., and Kondapi, A.K. (2013). Involvement of human topoisomerase II isoforms in HIV-1 reverse transcription. *Arch. Biochem. Biophys.* *532*, 91–102.
- Long, M.D., Smiraglia, D.J., and Campbell, M.J. (2017). The Genomic Impact of DNA CpG Methylation on Gene Expression; Relationships in Prostate Cancer. *Biomolecules* *7*.
- Louboutin, J.-P., and Strayer, D. (2014). Role of Oxidative Stress in HIV-1-Associated Neurocognitive Disorder and Protection by Gene Delivery of Antioxidant Enzymes. *Antioxidants* *3*, 770–797.

- Lowrey, A.J., Cramblet, W., and Bentz, G.L. (2017). Viral manipulation of the cellular sumoylation machinery. *Cell Commun. Signal. CCS* 15.
- Lu, H., Li, Z., Xue, Y., and Zhou, Q. (2013). Viral–Host Interactions That Control HIV-1 Transcriptional Elongation. *Chem. Rev.* 113, 8567–8582.
- Lu, H., Li, Z., Xue, Y., Schulze-Gahmen, U., Johnson, J.R., Krogan, N.J., Alber, T., and Zhou, Q. (2014). AFF1 is a ubiquitous P-TEFb partner to enable Tat extraction of P-TEFb from 7SK snRNP and formation of SECs for HIV transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E15–E24.
- Luo, X., and He, J.J. (2015). Cell-cell contact viral transfer contributes to HIV infection and persistence in astrocytes. *J. Neurovirol.* 21, 66–80.
- 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.
- Lusic, M., Marini, B., Ali, H., Lucic, B., Luzzati, R., and Giacca, M. (2013). Proximity to PML nuclear bodies regulates HIV-1 latency in CD4+ T cells. *Cell Host Microbe* 13, 665–677.
- Lynch, R.M., Boritz, E., Coates, E.E., DeZure, A., Madden, P., Costner, P., Enama, M.E., Plummer, S., Holman, L., Hendel, C.S., et al. (2015). Virologic effects of broadly neutralizing antibody VRC01 administration during chronic HIV-1 infection. *Sci. Transl. Med.* 7, 319ra206.
- Macián, F., and Rao, A. (1999). Reciprocal modulatory interaction between human immunodeficiency virus type 1 Tat and transcription factor NFAT1. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3645–3653.
- MacPherson, M.J., Beatty, L.G., Zhou, W., Du, M., and Sadowski, P.D. (2009). The CTCF Insulator Protein Is Posttranslationally Modified by SUMO. *Mol. Cell. Biol.* 29, 714–725.
- Madu, I.G., Namanja, A.T., Su, Y., Wong, S., Li, Y.-J., and Chen, Y. (2013). IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NEW CHEMOTYPE OF NON-COVALENT SENP INHIBITORS. *ACS Chem. Biol.* 8, 1435–1441.
- Madu, I.G., Li, S., Li, B., Li, H., Chang, T., Li, Y.-J., Vega, R., Rossi, J., Yee, J.-K., Zaia, J., et al. (2015). A Novel Class of HIV-1 Antiviral Agents Targeting HIV via a SUMOylation-Dependent Mechanism. *Sci. Rep.* 5.
- Mahmoudi, T., Parra, M., Vries, R.G.J., Kauder, S.E., Verrijzer, C.P., Ott, M., and Verdin, E. (2006). The SWI/SNF Chromatin-remodeling Complex Is a Cofactor for Tat Transactivation of the HIV Promoter. *J. Biol. Chem.* 281, 19960–19968.
- Mailler, E., Bernacchi, S., Marquet, R., Paillart, J.-C., Vivet-Boudou, V., and Smyth, R.P. (2016). The Life-Cycle of the HIV-1 Gag–RNA Complex. *Viruses* 8.
- Maillot, B., Lévy, N., Eiler, S., Crucifix, C., Granger, F., Richert, L., Didier, P., Godet, J., Pradeau-Aubret, K., Emiliani, S., et al. (2013). Structural and functional role of INI1 and LEDGF in the HIV-1 preintegration complex. *PloS One* 8, e60734.
- Malcolm, T., Chen, J., Chang, C., and Sadowski, I. (2007). Induction of chromosomally integrated HIV-1 LTR requires RBF-2 (USF/TFII-I) and Ras/MAPK signaling. *Virus Genes* 35, 215–223.

- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R. (1989). The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338, 254–257.
- Manic, G., Maurin-Marlin, A., Laurent, F., Vitale, I., Thierry, S., Delelis, O., Dessen, P., Vincendeau, M., Leib-Mösch, C., Hazan, U., et al. (2013). Impact of the Ku complex on HIV-1 expression and latency. *PLoS One* 8, e69691.
- Mansky, L.M., and Temin, H.M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* 69, 5087–5094.
- Marban, C., Redel, L., Suzanne, S., Van Lint, C., Lecestre, D., Chasserot-Golaz, S., Leid, M., Aunis, D., Schaeffer, E., and Rohr, O. (2005). COUP-TF interacting protein 2 represses the initial phase of HIV-1 gene transcription in human microglial cells. *Nucleic Acids Res.* 33, 2318–2331.
- Marban, C., Suzanne, S., Dequiedt, F., de Walque, S., Redel, L., Van Lint, C., Aunis, D., and Rohr, O. (2007). Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J.* 26, 412–423.
- Marban, C., Su, T., Ferrari, R., Li, B., Vatakis, D., Pellegrini, M., Zack, J.A., Rohr, O., and Kurdistani, S.K. (2011). Genome-wide binding map of the HIV-1 Tat protein to the human genome. *PLoS One* 6, e26894.
- Marcondes, M.C., Burudi, E.M., Huitron-Resendiz, S., Sanchez-Alavez, M., Watry, D., Zandonatti, M., Henriksen, S.J., and Fox, H.S. (2001). Highly activated CD8(+) T cells in the brain correlate with early central nervous system dysfunction in simian immunodeficiency virus infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 5429–5438.
- Mareuil, J. de, Carre, M., Barbier, P., Campbell, G.R., Lancelot, S., Opi, S., Esquieu, D., Watkins, J.D., Prevot, C., Braguer, D., et al. (2005). HIV-1 Tat protein enhances Microtubule polymerization. *Retrovirology* 2, 5.
- Margottin, F., Bour, S.P., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strelbel, K., and Benarous, R. (1998). A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol. Cell* 1, 565–574.
- Mariani, S.A., Vicenzi, E., and Poli, G. (2011). Asymmetric HIV-1 co-receptor use and replication in CD4+ T lymphocytes. *J. Transl. Med.* 9, S8.
- Marini, B., Kertesz-Farkas, A., Ali, H., Lucic, B., Lisek, K., Manganaro, L., Pongor, S., Luzzati, R., Recchia, A., Mavilio, F., et al. (2015). Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection. *Nature* 521, 227–231.
- Mario, G.-D. (2013). SUMO Tasks in Chromatin Remodeling.
- Markert, A., Grimm, M., Martinez, J., Wiesner, J., Meyerhans, A., Meyuhas, O., Sickmann, A., and Fischer, U. (2008). The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. *EMBO Rep.* 9, 569–575.

- Martínez-Bonet, M., Puertas, M.C., Fortuny, C., Ouchi, D., Mellado, M.J., Rojo, P., Noguera-Julian, A., Muñoz-Fernández, M.A., and Martínez-Picado, J. (2015a). Establishment and Replenishment of the Viral Reservoir in Perinatally HIV-1-infected Children Initiating Very Early Antiretroviral Therapy. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *61*, 1169–1178.
- Martínez-Bonet, M., Clemente, M.I., Serramía, M.J., Muñoz, E., Moreno, S., and Muñoz-Fernández, M.Á. (2015b). Synergistic Activation of Latent HIV-1 Expression by Novel Histone Deacetylase Inhibitors and Bryostatins. *Sci. Rep.* *5*, 16445.
- Masclé, X.H., Germain-Desprez, D., Huynh, P., Estéphan, P., and Aubry, M. (2007). Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J. Biol. Chem.* *282*, 10190–10202.
- Matic, I., van Hagen, M., Schimmel, J., Macek, B., Ogg, S.C., Tatham, M.H., Hay, R.T., Lamond, A.I., Mann, M., and Vertegaal, A.C.O. (2008). In vivo identification of human small ubiquitin-like modifier polymerization sites by high accuracy mass spectrometry and an in vitro to in vivo strategy. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *7*, 132–144.
- Matsui, M., Warburton, R.J., Cogswell, P.C., Baldwin, A.S., and Frelinger, J.A. (1996). Effects of HIV-1 Tat on expression of HLA class I molecules. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* *11*, 233–240.
- Mattoscio, D., and Chiocca, S. (2015). SUMO pathway components as possible cancer biomarkers. *Future Oncol. Lond. Engl.* *11*, 1599–1610.
- Mattoscio, D., Segré, C.V., and Chiocca, S. (2013). Viral manipulation of cellular protein conjugation pathways: The SUMO lesson. *World J. Virol.* *2*, 79–90.
- Matunis, M.J., and Rodriguez, M.S. (2016). Concepts and Methodologies to Study Protein SUMOylation: An Overview. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1475*, 3–22.
- Mayol, K., Munier, S., Beck, A., Verrier, B., and Guillon, C. (2007). Design and characterization of an HIV-1 Tat mutant: inactivation of viral and cellular functions but not antigenicity. *Vaccine* *25*, 6047–6060.
- Mazucca, P., Caruso, A., and Caccuri, F. (2016). HIV-1 infection, microenvironment and endothelial cell dysfunction. *New Microbiol.* *39*, 163–173.
- Mbonye, U.R., Wang, B., Gokulrangan, G., Chance, M.R., and Karn, J. (2015). Phosphorylation of HEXIM1 at Tyr271 and Tyr274 Promotes Release of P-TEFb from the 7SK snRNP Complex and Enhances Proviral HIV Gene Expression. *PROTEOMICS* *15*, 2078–2086.
- McDonald, D., Wu, L., Bohks, S.M., KewalRamani, V.N., Unutmaz, D., and Hope, T.J. (2003). Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* *300*, 1295–1297.
- McGary, C.S., Deleage, C., Harper, J., Micci, L., Ribeiro, S.P., Paganini, S., Kuri-Cervantes, L., Benne, C., Ryan, E.S., Balderas, R., et al. (2017). CTLA-4+PD-1- Memory CD4+ T Cells Critically Contribute to Viral Persistence in Antiretroviral Therapy-Suppressed, SIV-Infected Rhesus Macaques. *Immunity* *47*, 776-788.e5.
- McNamara, L.A., and Collins, K.L. (2011). Hematopoietic stem/precursor cells as HIV reservoirs. *Curr. Opin. HIV AIDS* *6*, 43–48.

- McNamara, R.P., Reeder, J.E., McMillan, E.A., Bacon, C.W., McCann, J.L., and D'Orso, I. (2016). KAP1 Recruitment of the 7SK snRNP Complex to Promoters Enables Transcription Elongation by RNA Polymerase II. *Mol. Cell* 61, 39–53.
- Medyouf, H., and Ghysdael, J. (2008). The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 297–303.
- Meehan, A.M., Saenz, D.T., Guevera, R., Morrison, J.H., Peretz, M., Fadel, H.J., Hamada, M., van Deursen, J., and Poeschla, E.M. (2014). A cyclophilin homology domain-independent role for Nup358 in HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* 10, e1003969.
- Meylan, S., Groner, A.C., Ambrosini, G., Malani, N., Quenneville, S., Zangger, N., Kapopoulou, A., Kauzlaric, A., Rougemont, J., Ciuffi, A., et al. (2011). A gene-rich, transcriptionally active environment and the pre-deposition of repressive marks are predictive of susceptibility to KRAB/KAP1-mediated silencing. *BMC Genomics* 12, 378.
- Michels, A.A., Nguyen, V.T., Fraldi, A., Labas, V., Edwards, M., Bonnet, F., Lania, L., and Bensaude, O. (2003). MAQ1 and 7SK RNA Interact with CDK9/Cyclin T Complexes in a Transcription-Dependent Manner. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4859.
- Michels, A.A., Fraldi, A., Li, Q., Adamson, T.E., Bonnet, F., Nguyen, V.T., Sedore, S.C., Price, J.P., Price, D.H., Lania, L., et al. (2004). Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *EMBO J.* 23, 2608–2619.
- Michienzi, A., Li, S., Zaia, J.A., and Rossi, J.J. (2002). A nucleolar TAR decoy inhibitor of HIV-1 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 14047–14052.
- Mikulak, J., Oriolo, F., Zaghi, E., Di Vito, C., and Mavilio, D. (2017). Natural killer cells in HIV-1 infection and therapy. *AIDS Lond. Engl.* 31, 2317–2330.
- Miles, B., and Connick, E. (2016). TFH in HIV Latency and as Sources of Replication Competent Virus. *Trends Microbiol.* 24, 338–344.
- Miller, E., and Bhardwaj, N. (2013). Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* 254, 170–189.
- Mizutani, T., Ishizaka, A., Tomizawa, M., Okazaki, T., Yamamichi, N., Kawana-Tachikawa, A., Iwamoto, A., and Iba, H. (2009). Loss of the Brm-Type SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex Is a Strong Barrier to the Tat-Independent Transcriptional Elongation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcripts. *J. Virol.* 83, 11569–11580.
- Mlcochova, P., Caswell, S.J., Taylor, I.A., Towers, G.J., and Gupta, R.K. (2018). DNA damage induced by topoisomerase inhibitors activates SAMHD1 and blocks HIV-1 infection of macrophages. *EMBO J.* 37, 50–62.
- Mocchetti, I., Bachis, A., and Avdoshina, V. (2012). Neurotoxicity of human immunodeficiency virus-1: viral proteins and axonal transport. *Neurotox. Res.* 21, 79–89.
- Moir, S., and Fauci, A.S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 235–245.
- Monette, A., Valiente-Echeverría, F., Rivero, M., Cohen, É.A., Lopez-Lastra, M., and Mouland, A.J. (2013). Dual mechanisms of translation initiation of the full-length HIV-1 mRNA contribute to gag synthesis. *PloS One* 8, e68108.

- Montano, M.A., Kripke, K., Norina, C.D., Achacoso, P., Herzenberg, L.A., Roy, A.L., and Nolan, G.P. (1996). NF-kappa B homodimer binding within the HIV-1 initiator region and interactions with TFII-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 12376–12381.
- Moreau, M., Le Tortorec, A., Deleage, C., Brown, C., Denis, H., Satie, A.-P., Bourry, O., Deureudde-Bosquet, N., Roques, P., Le Grand, R., et al. (2012). Impact of short-term HAART initiated during the chronic stage or shortly post-exposure on SIV infection of male genital organs. *PloS One* *7*, e37348.
- Moriyama, T., Sangel, P., Yamaguchi, H., Obuse, C., Miyamoto, Y., Oka, M., and Yoneda, Y. (2015). Identification and characterization of a nuclear localization signal of TRIM28 that overlaps with the HP1 box. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *462*, 201–207.
- Mousseau, G., and Valente, S.T. (2016). Didehydro-Cortistatin A: a new player in HIV-therapy? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* *14*, 145.
- Mousseau, G., Clementz, M.A., Bakeman, W.N., Nagarsheth, N., Cameron, M., Shi, J., Baran, P., Fromentin, R., Chomont, N., and Valente, S.T. (2012). An analog of the natural steroidal alkaloid cortistatin A potently suppresses Tat-dependent HIV transcription. *Cell Host Microbe* *12*, 97–108.
- Mousseau, G., Mediouni, S., and Valente, S.T. (2015). Targeting HIV Transcription: The Quest for a Functional Cure. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *389*, 121.
- Moyes, D.L., Islam, A., Kohli, A., and Naglik, J.R. (2016). Oral epithelial cells and their interactions with HIV-1. *Oral Dis.* *22 Suppl 1*, 66–72.
- Muniz, L., Egloff, S., Ughy, B., Jády, B.E., and Kiss, T. (2010). Controlling cellular P-TEFb activity by the HIV-1 transcriptional transactivator Tat. *PLoS Pathog.* *6*, e1001152.
- Murray, A.J., Kwon, K.J., Farber, D.L., and Siliciano, R.F. (2016). The Latent Reservoir for HIV-1: How Immunologic Memory and Clonal Expansion Contribute to HIV-1 Persistence. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *197*, 407–417.
- Musinova, Y.R., Sheval, E.V., Dib, C., Germini, D., and Vassetzky, Y.S. (2016). Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 589–601.
- Nagl, N.G., Wang, X., Patsialou, A., Van Scoy, M., and Moran, E. (2007). Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control. *EMBO J.* *26*, 752–763.
- Narayan, V., Ravindra, K.C., Chiaro, C., Cary, D., Aggarwal, B.B., Henderson, A.J., and Prabhu, K.S. (2011). Celastrol inhibits Tat-mediated human immunodeficiency virus (HIV) transcription and replication. *J. Mol. Biol.* *410*, 972–983.
- Natarajan, M., August, A., and Henderson, A.J. (2010). Combinatorial Signals from CD28 Differentially Regulate Human Immunodeficiency Virus Transcription in T Cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 17338–17347.
- Natarajan, M., Schiralli Lester, G.M., Lee, C., Missra, A., Wasserman, G.A., Steffen, M., Gilmour, D.S., and Henderson, A.J. (2013). Negative elongation factor (NELF) coordinates RNA polymerase II pausing, premature termination, and chromatin remodeling to regulate HIV transcription. *J. Biol. Chem.* *288*, 25995–26003.

- Ne, E., Palstra, R.-J., and Mahmoudi, T. (2018). Transcription: Insights From the HIV-1 Promoter. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 335, 191–243.
- Neel, C., Etienne, L., Li, Y., Takehisa, J., Rudicell, R.S., Ndong Bass, I., Moudindo, J., Mebenga, A., Esteban, A., Van Heuverswyn, F., et al. (2010). Molecular Epidemiology of Simian Immunodeficiency Virus Infection in Wild-Living Gorillas. *J. Virol.* 84, 1464–1476.
- Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425–430.
- Nepveu-Traversy, M.-É., Demogines, A., Fricke, T., Plourde, M.B., Riopel, K., Veillette, M., Diaz-Griffero, F., Sawyer, S.L., and Berthou, L. (2016). A putative SUMO interacting motif in the B30.2/SPRY domain of rhesus macaque TRIM5 α important for NF- κ B/AP-1 signaling and HIV-1 restriction. *Heliyon* 2.
- Nguyen, K., Das, B., Dobrowolski, C., and Karn, J. (2017). Multiple Histone Lysine Methyltransferases Are Required for the Establishment and Maintenance of HIV-1 Latency. *MBio* 8, e00133-17.
- Nguyen, V.T., Kiss, T., Michels, A.A., and Bensaude, O. (2001). 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* 414, 322–325.
- Ni, H.-J., Chang, Y.-N., Kao, P.-H., Chai, S.-P., Hsieh, Y.-H., Wang, D.-H., and Fong, J.C. (2012). Depletion of SUMO ligase hMMS21 impairs G1 to S transition in MCF-7 breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 1893–1900.
- Nickel, W., and Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 148–155.
- Nilson, K.A., and Price, D.H. (2011). The Role of RNA Polymerase II Elongation Control in HIV-1 Gene Expression, Replication, and Latency. *Genet. Res. Int.* 2011, 726901.
- Nishitsuji, H., Abe, M., Sawada, R., and Takaku, H. (2012). ZBRK1 represses HIV-1 LTR-mediated transcription. *FEBS Lett.* 586, 3562–3568.
- Nishitsuji, H., Sawada, L., Sugiyama, R., and Takaku, H. (2015). ZNF10 inhibits HIV-1 LTR activity through interaction with NF- κ B and Sp1 binding motifs. *FEBS Lett.* 589, 2019–2025.
- Nyagol, J., Leucci, E., Onnis, A., De Falco, G., Tigli, C., Sanseverino, F., Torricelli, M., Palumbo, N., Pacenti, L., Santopietro, R., et al. (2006). The effects of HIV-1 Tat protein on cell cycle during cervical carcinogenesis. *Cancer Biol. Ther.* 5, 684–690.
- Obata, M., Kominami, R., and Mishima, Y. (2012). BCL11B tumor suppressor inhibits HDM2 expression in a p53-dependent manner. *Cell. Signal.* 24, 1047–1052.
- O'Brien, S.K., Cao, H., Nathans, R., Ali, A., and Rana, T.M. (2010). P-TEFb Kinase Complex Phosphorylates Histone H1 to Regulate Expression of Cellular and HIV-1 Genes. *J. Biol. Chem.* 285, 29713–29720.
- O'Brien, W.A., Koyanagi, Y., Namazie, A., Zhao, J.Q., Diagne, A., Idler, K., Zack, J.A., and Chen, I.S. (1990). HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* 348, 69–73.

- Okamoto, K., Kitabayashi, I., and Taya, Y. (2006). KAP1 dictates p53 response induced by chemotherapeutic agents via Mdm2 interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *351*, 216–222.
- Okazuka, K., Wakabayashi, Y., Kashihara, M., Inoue, J., Sato, T., Yokoyama, M., Aizawa, S., Aizawa, Y., Mishima, Y., and Kominami, R. (2005). p53 prevents maturation of T cell development to the immature CD4-CD8+ stage in Bcl11b^{-/-} mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *328*, 545–549.
- Okulicz, J.F., and Lambotte, O. (2011). Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers. *Curr. Opin. HIV AIDS* *6*, 163–168.
- Ott, M., Schnölzer, 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.
- Ott, M., Geyer, M., and Zhou, Q. (2011). The Control of HIV Transcription: Keeping RNA Polymerase II on Track. *Cell Host Microbe* *10*, 426.
- Ouyang, J., Shi, Y., Valin, A., Xuan, Y., and Gill, G. (2009). Direct binding of CoREST1 to SUMO-2/3 contributes to gene-specific repression by the LSD1/CoREST1/HDAC complex. *Mol. Cell* *34*, 145–154.
- Pagans, S., Pedal, A., North, B.J., Kaehlcke, K., Marshall, B.L., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Henklein, P., Frye, R., McBurney, M.W., et al. (2005). SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol.* *3*, e41.
- Pagans, S., Kauder, S.E., Kaehlcke, K., Sakane, N., Schroeder, S., Dormeyer, W., Trievel, R.C., Verdin, E., Schnolzer, M., and Ott, M. (2010). The Cellular lysine methyltransferase Set7/9-KMT7 binds HIV-1 TAR RNA, monomethylates the viral transactivator Tat, and enhances HIV transcription. *Cell Host Microbe* *7*, 234–244.
- Paillart, J.C., Westhof, E., Ehresmann, C., Ehresmann, B., and Marquet, R. (1997). Non-canonical interactions in a kissing loop complex: the dimerization initiation site of HIV-1 genomic RNA. *J. Mol. Biol.* *270*, 36–49.
- Pan, X., Baldauf, H.-M., Keppler, O.T., and Fackler, O.T. (2013). Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4+ T lymphocytes. *Cell Res.* *23*, 876–885.
- Parada, C.A., and Roeder, R.G. (1996). Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature* *384*, 375–378.
- Park, S., Stanfield, R.L., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J., Wilson, I.A., and Wright, P.E. (2017). Role of the CBP catalytic core in intramolecular SUMOylation and control of histone H3 acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E5335–E5342.
- Patel, D., Antwi, J., Koneru, P.C., Serrao, E., Forli, S., Kessl, J.J., Feng, L., Deng, N., Levy, R.M., Fuchs, J.R., et al. (2016). A New Class of Allosteric HIV-1 Integrase Inhibitors Identified by Crystallographic Fragment Screening of the Catalytic Core Domain. *J. Biol. Chem.* *291*, 23569–23577.
- Pauza, C.D. (1990). Two bases are deleted from the termini of HIV-1 linear DNA during integrative recombination. *Virology* *179*, 886–889.

- Peeters, M., Gueye, A., Mboup, S., Bibollet-Ruche, F., Ekaza, E., Mulanga, C., Ouedrago, R., Gandji, R., Mpele, P., Dibanga, G., et al. (1997). Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS Lond. Engl.* *11*, 493–498.
- Peng, H., Begg, G.E., Schultz, D.C., Friedman, J.R., Jensen, D.E., Speicher, D.W., and Rauscher, F.J. (2000). Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* *295*, 1139–1162.
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J.T., and Price, D.H. (1998). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev.* *12*, 755–762.
- Permatasari, H.K., Nakahata, S., Ichikawa, T., and Morishita, K. (2017). BCL11B is frequently downregulated in HTLV-1-infected T-cells through Tax-mediated proteasomal degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *490*, 1086–1092.
- Perreau, M., Banga, R., and Pantaleo, G. (2017). Targeted Immune Interventions for an HIV-1 Cure. *Trends Mol. Med.* *23*, 945–961.
- Persaud, D., Gay, H., Ziemiak, C., Chen, Y.H., Piatak, M., Chun, T.-W., Strain, M., Richman, D., and Luzuriaga, K. (2013). Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant. *N. Engl. J. Med.* *369*, 1828–1835.
- Petravic, J., Rasmussen, T.A., Lewin, S.R., Kent, S.J., and Davenport, M.P. (2017). Relationship between Measures of HIV Reactivation and Decline of the Latent Reservoir under Latency-Reversing Agents. *J. Virol.* *91*.
- Pichler, A., Fatouros, C., Lee, H., and Eisenhardt, N. (2017). SUMO conjugation – a mechanistic view. *Biomol. Concepts* *8*.
- Piguet, V., and Steinman, R.M. (2007). The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways. *Trends Immunol.* *28*, 503–510.
- Pineda, C.T., Ramanathan, S., Fon Tacer, K., Weon, J.L., Potts, M.B., Ou, Y.-H., White, M.A., and Potts, P.R. (2015). Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase. *Cell* *160*, 715–728.
- Ping, Y.-H., and Rana, T.M. (2001). DSIF and NELF Interact with RNA Polymerase II Elongation Complex and HIV-1 Tat Stimulates P-TEFb-mediated Phosphorylation of RNA Polymerase II and DSIF during Transcription Elongation. *J. Biol. Chem.* *276*, 12951–12958.
- Pion, M., Granelli-Piperno, A., Mangeat, B., Stalder, R., Correa, R., Steinman, R.M., and Piguet, V. (2006). APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* *203*, 2887–2893.
- Plantier, J.-C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D.L., and Simon, F. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* *15*, 871–872.
- Platt, E.J., Wehrly, K., Kuhmann, S.E., Chesebro, B., and Kabat, D. (1998). Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* *72*, 2855–2864.

- Pocernich, C.B., Sultana, R., Mohammad-Abdul, H., Nath, A., and Butterfield, D.A. (2005). HIV-dementia, Tat-induced oxidative stress, and antioxidant therapeutic considerations. *Brain Res. Rev.* *50*, 14–26.
- Pollard, V.W., and Malim, M.H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* *52*, 491–532.
- Pommier, Y., Poddevin, B., Gupta, M., and Jenkins, J. (1994). DNA topoisomerases I & II cleavage sites in the type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1) DNA promoter region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *205*, 1601–1609.
- Popov, S., Rexach, M., Ratner, L., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998). Viral Protein R Regulates Docking of the HIV-1 Preintegration Complex to the Nuclear Pore Complex. *J. Biol. Chem.* *273*, 13347–13352.
- Poropatich, K., and Sullivan, D.J. (2011). Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *J. Gen. Virol.* *92*, 247–268.
- Proudfoot, N.J., Lee, B.A., and Monks, J. (1992). Multiple SP1 binding sites confer enhancer-independent, replication-activated transcription of HIV-1 and globin gene promoters. *New Biol.* *4*, 369–381.
- Quénet, D., Gasser, V., Fouillen, L., Cammas, F., Sanglier-Cianferani, S., Losson, R., and Dantzer, F. (2008). The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1beta and the heterochromatin protein HP1alpha. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *22*, 3853–3865.
- Quenneville, S., Verde, G., Corsinotti, A., Kapopoulou, A., Jakobsson, J., Offner, S., Baglivo, I., Pedone, P.V., Grimaldi, G., Riccio, A., et al. (2011). In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol. Cell* *44*, 361–372.
- Quinn, T.C., Wawer, M.J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., Meehan, M.O., Lutalo, T., and Gray, R.H. (2000). Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N. Engl. J. Med.* *342*, 921–929.
- Quivy, V., and Lint, C.V. (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.
- Rafati, H., Parra, M., Hakre, S., Moshkin, Y., Verdin, E., and Mahmoudi, T. (2011). Repressive LTR Nucleosome Positioning by the BAF Complex Is Required for HIV Latency. *PLoS Biol.* *9*.
- Rafati, H., Parra, M., Hakre, S., Moshkin, Y., Verdin, E., and Mahmoudi, T. (2015). Correction: Repressive LTR Nucleosome Positioning by the BAF Complex Is Required for HIV Latency. *PLoS Biol.* *13*, e1002302.
- Rauwel, B., Jang, S.M., Cassano, M., Kapopoulou, A., Barde, I., and Trono, D. (2015). Release of human cytomegalovirus from latency by a KAP1/TRIM28 phosphorylation switch. *ELife* *4*.

- Rayne, F., Debaisieux, S., Yezid, H., Lin, Y.-L., Mettling, C., Konate, K., Chazal, N., Arold, S.T., Pugnère, M., Sanchez, F., et al. (2010). Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate enables efficient secretion of HIV-1 Tat by infected T-cells. *EMBO J.* *29*, 1348.
- Rechem, C.V., Boulay, G., Pinte, S., Stankovic-Valentin, N., Guérardel, C., and Leprince, D. (2010). Differential Regulation of HIC1 Target Genes by CtBP and NuRD, via an Acetylation/SUMOylation Switch, in Quiescent versus Proliferating Cells. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 4045–4059.
- Reil, H., Bukovsky, A.A., Gelderblom, H.R., and Göttlinger, H.G. (1998). Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *EMBO J.* *17*, 2699–2708.
- Richard, J., Sindhu, S., Pham, T.N.Q., Belzile, J.-P., and Cohen, E.A. (2010). HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood* *115*, 1354–1363.
- Riclet, R., Chendeb, M., Vonesch, J.-L., Koczan, D., Thiesen, H.-J., Losson, R., and Cammas, F. (2009). Disruption of the Interaction between Transcriptional Intermediary Factor 1 β and Heterochromatin Protein 1 Leads to a Switch from DNA Hyper- to Hypomethylation and H3K9 to H3K27 Trimethylation on the MEST Promoter Correlating with Gene Reactivation. *Mol. Biol. Cell* *20*, 296–305.
- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.* *10*, 853–858.
- Rock, R.B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W.S., Cheeran, M., Lokensgard, J.R., and Peterson, P.K. (2004). Role of Microglia in Central Nervous System Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* *17*, 942–964.
- Rodés, B., Toro, C., Paxinos, E., Poveda, E., Martinez-Padial, M., Benito, J.M., Jimenez, V., Wrin, T., Bassani, S., and Soriano, V. (2004). Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection. *AIDS Lond. Engl.* *18*, 1109–1116.
- Roebuck, K.A., and Saifuddin, M. (1999). Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr.* *8*, 67–84.
- Rohr, O., Lecestre, D., Chasserot-Golaz, S., Marban, C., Avram, D., Aunis, D., Leid, M., and Schaeffer, E. (2003a). Recruitment of Tat to Heterochromatin Protein HP1 via Interaction with CTIP2 Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Microglial Cells. *J. Virol.* *77*, 5415–5427.
- Rohr, O., Marban, C., Aunis, D., and Schaeffer, E. (2003b). Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells. *J. Leukoc. Biol.* *74*, 736–749.
- Romani, B., Engelbrecht, S., and Glashoff, R.H. (2010). Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* *91*, 1–12.
- 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.
- Rosonina, E., Akhter, A., Dou, Y., Babu, J., and Sri Theivakadacham, V.S. (2017). Regulation of transcription factors by sumoylation. *Transcription* *8*, 220–231.

- Rowland-Jones, S.L. (2003). Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat. Rev. Immunol.* 3, 343–348.
- Ruben, S., Perkins, A., Purcell, R., Joung, K., Sia, R., Burghoff, R., Haseltine, W.A., and Rosen, C.A. (1989). Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* 63, 1–8.
- Ruelas, D.S., and Greene, W.C. (2013). An Integrated Overview of HIV-1 Latency. *Cell* 155, 519–529.
- Ryan, R.F., Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Singh, P.B., Friedman, J.R., Fredericks, W.J., and Rauscher, F.J. (1999). KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Krüppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4366–4378.
- Sáez-Ciri3n, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., Potard, V., Versmisse, P., Melard, A., Prazuck, T., et al. (2013). Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog.* 9, e1003211.
- Sagnier, S., Daussy, C.F., Borel, S., Robert-Hebmann, V., Faure, M., Blanchet, F.P., Beaumelle, B., Biard-Piechaczyk, M., and Espert, L. (2015). Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* 89, 615–625.
- Sahin, U., Ferhi, O., Carnec, X., Zamborlini, A., Peres, L., Jollivet, F., Vitaliano-Prunier, A., de Th3, H., and Lallemand-Breitenbach, V. (2014). Interferon controls SUMO availability via the Lin28 and let-7 axis to impede virus replication. *Nat. Commun.* 5, 4187.
- Sakane, N., Kwon, H.-S., Pagans, S., Kaehlcke, K., Mizusawa, Y., Kamada, M., Lassen, K.G., Chan, J., Greene, W.C., Schnoelzer, M., et al. (2011). Activation of HIV transcription by the viral Tat protein requires a demethylation step mediated by lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1). *PLoS Pathog.* 7, e1002184.
- Sawaya, B.E., Khalili, K., Gordon, J., Taube, R., and Amini, S. (2000). Cooperative interaction between HIV-1 regulatory proteins Tat and Vpr modulates transcription of the viral genome. *J. Biol. Chem.* 275, 35209–35214.
- Schaller, T., Ocwieja, K.E., Rasaiyaah, J., Price, A.J., Brady, T.L., Roth, S.L., Hu3, S., Fletcher, A.J., Lee, K., KewalRamani, V.N., et al. (2011). HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency. *PLoS Pathog.* 7, e1002439.
- Scherer, M., and Stamminger, T. (2016). Emerging Role of PML Nuclear Bodies in Innate Immune Signaling. *J. Virol.* 90, 5850–5854.
- Schr3der, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521–529.
- Schr3felbauer, B., Yu, Q., Zeitlin, S.G., and Landau, N.R. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases. *J. Virol.* 79, 10978–10987.

- Schulte, A., Czudnochowski, N., Barboric, M., Schönichen, A., Blazek, D., Peterlin, B.M., and Geyer, M. (2005a). Identification of a cyclin T-binding domain in Hexim1 and biochemical analysis of its binding competition with HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.* *280*, 24968–24977.
- Schulte, A., Czudnochowski, N., Barboric, M., Schönichen, A., Blazek, D., Peterlin, B.M., and Geyer, M. (2005b). Identification of a cyclin T-binding domain in Hexim1 and biochemical analysis of its binding competition with HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.* *280*, 24968–24977.
- Schultz, D.C., Friedman, J.R., and Rauscher, F.J. (2001a). Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2 α subunit of NuRD. *Genes Dev.* *15*, 428–443.
- Schultz, D.C., Friedman, J.R., and Rauscher, F.J. (2001b). Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2 α subunit of NuRD. *Genes Dev.* *15*, 428–443.
- Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G., and Rauscher, F.J. (2002). SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.* *16*, 919–932.
- Schulze-Gahmen, U., Upton, H., Birnberg, A., Bao, K., Chou, S., Krogan, N.J., Zhou, Q., and Alber, T. (2013). The AFF4 scaffold binds human P-TEFb adjacent to HIV Tat. *ELife* *2*.
- Schust, D.J., Quayle, A.J., and Amedee, A.M. (2012). Mucosal co-infections and HIV-1 transmission and pathogenesis. *Curr. HIV Res.* *10*, 195–201.
- von Schwedler, U., Kornbluth, R.S., and Trono, D. (1994). The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 6992–6996.
- Scully, E., and Alter, G. (2016). NK Cells in HIV Disease. *Curr. HIV/AIDS Rep.* *13*, 85–94.
- Scutari, R., Alteri, C., Perno, C.F., Svicher, V., and Aquaro, S. (2017). The Role of HIV Infection in Neurologic Injury. *Brain Sci.* *7*.
- Secchiero, P., Zella, D., Capitani, S., Gallo, R.C., and Zauli, G. (1999). Extracellular HIV-1 tat protein up-regulates the expression of surface CXC-chemokine receptor 4 in resting CD4⁺ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 2427–2431.
- Sedore, S.C., Byers, S.A., Biglione, S., Price, J.P., Maury, W.J., and Price, D.H. (2007). Manipulation of P-TEFb control machinery by HIV: recruitment of P-TEFb from the large form by Tat and binding of HEXIM1 to TAR. *Nucleic Acids Res.* *35*, 4347–4358.
- Selliah, N., Zhang, M., DeSimone, D., Kim, H., Brunner, M., Ittenbach, R.F., Rui, H., Cron, R.Q., and Finkel, T.H. (2006). The gammac-cytokine regulated transcription factor, STAT5, increases HIV-1 production in primary CD4 T cells. *Virology* *344*, 283–291.
- Seth, A., Hodge, D.R., Thompson, D.M., Robinson, L., Panayiotakis, A., Watson, D.K., and Papas, T.S. (1993). ETS family proteins activate transcription from HIV-1 long terminal repeat. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *9*, 1017–1023.

- Shang, H., Ding, J., Yu, S., Wu, T., Zhang, Q., and Liang, F. (2015). Progress and challenges in the use of latent HIV-1 reactivating agents. *Acta Pharmacol. Sin.* 36, 908–916.
- Sharp, P.M., and Hahn, B.H. (2011). *Origins of HIV and the AIDS Pandemic*. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 1.
- Sheridan, P.L., Sheline, C.T., Cannon, K., Voz, M.L., Pazin, M.J., Kadonaga, J.T., and Jones, K.A. (1995). Activation of the HIV-1 enhancer by the LEF-1 HMG protein on nucleosome-assembled DNA in vitro. *Genes Dev.* 9, 2090–2104.
- Shilatifard, A., Lane, W.S., Jackson, K.W., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1996). An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene. *Science* 271, 1873–1876.
- Shin, J.A., Choi, E.S., Kim, H.S., Ho, J.C.Y., Watts, F.Z., Park, S.D., and Jang, Y.K. (2005). SUMO modification is involved in the maintenance of heterochromatin stability in fission yeast. *Mol. Cell* 19, 817–828.
- Shore, S.M., Byers, S.A., Maury, W., and Price, D.H. (2003). Identification of a novel isoform of Cdk9. *Gene* 307, 175–182.
- Simon, F., Mauclère, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barré-Sinoussi, F., and Brun-Vézinet, F. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* 4, 1032–1037.
- Singh, P.K., Plumb, M.R., Ferris, A.L., Iben, J.R., Wu, X., Fadel, H.J., Luke, B.T., Esnault, C., Poeschla, E.M., Hughes, S.H., et al. (2015). LEDGF/p75 interacts with mRNA splicing factors and targets HIV-1 integration to highly spliced genes. *Genes Dev.* 29, 2287–2297.
- Siomi, H., Shida, H., Maki, M., and Hatanaka, M. (1990). Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. *J. Virol.* 64, 1803–1807.
- Sivakumaran, H., van der Horst, A., Fulcher, A.J., Apolloni, A., Lin, M.-H., Jans, D.A., and Harrich, D. (2009). Arginine methylation increases the stability of human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J. Virol.* 83, 11694–11703.
- Sloan, R.D., and Wainberg, M.A. (2011). The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology* 8, 52.
- Smith, M.Z., Wightman, F., and Lewin, S.R. (2012). HIV reservoirs and strategies for eradication. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 9, 5–15.
- Sobhian, B., Laguette, N., Yatim, A., Nakamura, M., Levy, Y., Kiernan, R., and Benkirane, M. (2010). HIV-1 Tat assembles a multifunctional transcription elongation complex and stably associates with the 7SK snRNP. *Mol. Cell* 38, 439–451.
- Soriano-Sarabia, N., Bateson, R.E., Dahl, N.P., Crooks, A.M., Kuruc, J.D., Margolis, D.M., and Archin, N.M. (2014). Quantitation of replication-competent HIV-1 in populations of resting CD4+ T cells. *J. Virol.* 88, 14070–14077.
- Soto-Rifo, R., Rubilar, P.S., Limousin, T., de Breyne, S., Décimo, D., and Ohlmann, T. (2012). DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *EMBO J.* 31, 3745–3756.

- Spivak, A.M., and Planelles, V. (2018). Novel Latency Reversing Agents for HIV-1 Cure. *Annu. Rev. Med.* 69, 421–436.
- Sripathy, S.P., Stevens, J., and Schultz, D.C. (2006). The KAP1 Corepressor Functions To Coordinate the Assembly of De Novo HP1-Demarcated Microenvironments of Heterochromatin Required for KRAB Zinc Finger Protein-Mediated Transcriptional Repression. *Mol. Cell. Biol.* 26, 8623–8638.
- Stark, L.A., and Hay, R.T. (1998). Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Viral Protein R (Vpr) Interacts with Lys-tRNA Synthetase: Implications for Priming of HIV-1 Reverse Transcription. *J. Virol.* 72, 3037–3044.
- Stauber, R.H., and Pavlakis, G.N. (1998). Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein. *Virology* 252, 126–136.
- Steger, D.J., and Workman, J.L. (1997). Stable co-occupancy of transcription factors and histones at the HIV-1 enhancer. *EMBO J.* 16, 2463–2472.
- Stevens, M., De Clercq, E., and Balzarini, J. (2006). The regulation of HIV-1 transcription: molecular targets for chemotherapeutic intervention. *Med. Res. Rev.* 26, 595–625.
- Stoltzfus, C.M. (2009). Chapter 1. Regulation of HIV-1 alternative RNA splicing and its role in virus replication. *Adv. Virus Res.* 74, 1–40.
- Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Anderson, D.J., Sundquist, W.I., and Sodroski, J. (2006). Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 α restriction factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5514–5519.
- Subramanian, T., Kuppuswamy, M., Venkatesh, L., Srinivasan, A., and Chinnadurai, G. (1990). Functional substitution of the basic domain of the HIV-1 trans-activator, Tat, with the basic domain of the functionally heterologous Rev. *Virology* 176, 178–183.
- Sun, R., Liang, D., Gao, Y., and Lan, K. (2014). Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded LANA Interacts with Host KAP1 To Facilitate Establishment of Viral Latency. *J. Virol.* 88, 7331–7344.
- Sundquist, W.I., and Kräusslich, H.-G. (2012). HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006924.
- Suzawa, M., Miranda, D.A., Ramos, K.A., Ang, K.K.-H., Faivre, E.J., Wilson, C.G., Caboni, L., Arkin, M.R., Kim, Y.-S., Fletterick, R.J., et al. (2015). A gene-expression screen identifies a non-toxic sumoylation inhibitor that mimics SUMO-less human LRH-1 in liver. *ELife* 4.
- Suzuki, Y., and Craigie, R. (2007). The road to chromatin — nuclear entry of retroviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 187–196.
- Suzuki, K., Shijuuku, T., Fukamachi, T., Zaunders, J., Guillemin, G., Cooper, D., and Kelleher, A. (2005). Prolonged transcriptional silencing and CpG methylation induced by siRNAs targeted to the HIV-1 promoter region. *J. RNAi Gene Silenc. Int. J. RNA Gene Target. Res.* 1, 66–78.

- Suzuki, K., Hattori, S., Marks, K., Ahlenstiel, C., Maeda, Y., Ishida, T., Millington, M., Boyd, M., Symonds, G., Cooper, D.A., et al. (2013). Promoter Targeting shRNA Suppresses HIV-1 Infection In vivo Through Transcriptional Gene Silencing. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2, e137.
- Svicher, V., Ceccherini-Silberstein, F., Antinori, A., Aquaro, S., and Perno, C.F. (2014). Understanding HIV compartments and reservoirs. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 11, 186–194.
- Swanstrom, R., and Coffin, J. (2012). HIV-1 Pathogenesis: The Virus. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2.
- Tabarrini, O., Stevens, M., Cecchetti, V., Sabatini, S., Dell’Uomo, M., Manfroni, G., Palumbo, M., Pannecouque, C., De Clercq, E., and Fravolini, A. (2004). Structure modifications of 6-aminoquinolones with potent anti-HIV activity. *J. Med. Chem.* 47, 5567–5578.
- Tahirov, T.H., Babayeva, N.D., Varzavand, K., Cooper, J.J., Sedore, S.C., and Price, D.H. (2010). Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* 465, 747.
- Tchasovnikarova, I.A., Timms, R.T., Matheson, N.J., Wals, K., Antrobus, R., Göttgens, B., Dougan, G., Dawson, M.A., and Lehner, P.J. (2015). Epigenetic silencing by the HUSH complex mediates position-effect variegation in human cells. *Science* 348, 1481–1485.
- Tebas, P., Stein, D., Tang, W.W., Frank, I., Wang, S.Q., Lee, G., Spratt, S.K., Surosky, R.T., Giedlin, M.A., Nichol, G., et al. (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 370, 901–910.
- Tebit, D.M., Ndemi, N., Weinberg, A., and Quiñones-Mateu, M.E. (2012). Mucosal Transmission of Human Immunodeficiency Virus. *Curr. HIV Res.* 10, 3–8.
- Thierry, E., Deprez, E., and Delelis, O. (2017). Different Pathways Leading to Integrase Inhibitors Resistance. *Front. Microbiol.* 7.
- Thierry, S., Thierry, E., Subra, F., Deprez, E., Leh, H., Bury-Moné, S., and Delelis, O. (2016). Opposite transcriptional regulation of integrated vs unintegrated HIV genomes by the NF-κB pathway. *Sci. Rep.* 6.
- Thorlund, K., Horwitz, M.S., Fife, B.T., Lester, R., and Cameron, D.W. (2017). Landscape review of current HIV ‘kick and kill’ cure research - some kicking, not enough killing. *BMC Infect. Dis.* 17.
- Tirard, M., Hsiao, H.-H., Nikolov, M., Urlaub, H., Melchior, F., and Brose, N. (2012). In vivo localization and identification of SUMOylated proteins in the brain of His6-HA-SUMO1 knock-in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 21122–21127.
- Toborek, M., Lee, Y.W., Flora, G., Pu, H., András, I.E., Wylegala, E., Hennig, B., and Nath, A. (2005). Mechanisms of the blood-brain barrier disruption in HIV-1 infection. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 181–199.
- Tomimatsu, N., Mukherjee, B., and Burma, S. (2009). Distinct roles of ATR and DNA-PKcs in triggering DNA damage responses in ATM-deficient cells. *EMBO Rep.* 10, 629–635.
- Ton, H., and Xiong, H. (2013). Astrocyte Dysfunctions and HIV-1 Neurotoxicity. *J. AIDS Clin. Res.* 4, 255.

- Trillo-Pazos, G., Diamanturos, A., Rislove, L., Menza, T., Chao, W., Belem, P., Sadiq, S., Morgello, S., Sharer, L., and Volsky, D.J. (2003). Detection of HIV-1 DNA in microglia/macrophages, astrocytes and neurons isolated from brain tissue with HIV-1 encephalitis by laser capture microdissection. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *13*, 144–154.
- Tripathy, M.K., McManamy, M.E.M., Burch, B.D., Archin, N.M., and Margolis, D.M. (2015). H3K27 Demethylation at the Proviral Promoter Sensitizes Latent HIV to the Effects of Vorinostat in Ex Vivo Cultures of Resting CD4+ T Cells. *J. Virol.* *89*, 8392–8405.
- Tu, J., Chen, Y., Cai, L., Xu, C., Zhang, Y., Chen, Y., Zhang, C., Zhao, J., Cheng, J., Xie, H., et al. (2015). Functional Proteomics Study Reveals SUMOylation of TFII-I is Involved in Liver Cancer Cell Proliferation. *J. Proteome Res.* *14*, 2385–2397.
- Turner, A.-M.W., and Margolis, D.M. (2017). Chromatin Regulation and the Histone Code in HIV Latency. *Yale J. Biol. Med.* *90*, 229–243.
- Turner, B.G., and Summers, M.F. (1999). Structural biology of HIV1. *J. Mol. Biol.* *285*, 1–32.
- Turriziani, B., Garcia-Munoz, A., Pilkington, R., Raso, C., Kolch, W., and von Kriegsheim, A. (2014). On-Beads Digestion in Conjunction with Data-Dependent Mass Spectrometry: A Shortcut to Quantitative and Dynamic Interaction Proteomics. *Biology* *3*, 320–332.
- Turville, S.G., Cameron, P.U., Handley, A., Lin, G., Pöhlmann, S., Doms, R.W., and Cunningham, A.L. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol.* *3*, 975–983.
- Tuttle, D.L., Harrison, J.K., Anders, C., Sleasman, J.W., and Goodenow, M.M. (1998). Expression of CCR5 Increases during Monocyte Differentiation and Directly Mediates Macrophage Susceptibility to Infection by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* *72*, 4962–4969.
- Tyagi, M., and Karn, J. (2007). CBF-1 promotes transcriptional silencing during the establishment of HIV-1 latency. *EMBO J.* *26*, 4985–4995.
- Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., and Giacca, M. (2001). Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* *276*, 3254–3261.
- Usach, I., Melis, V., and Peris, J.-E. (2013). Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: a review on pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability. *J. Int. AIDS Soc.* *16*, 1–14.
- Vallari, A., Bodelle, P., Ngansop, C., Makamche, F., Ndembi, N., Mbanya, D., Kaptué, L., Gürtler, L.G., McArthur, C.P., Devare, S.G., et al. (2010). Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *26*, 109–115.
- Vallari, A., Holzmayer, V., Harris, B., Yamaguchi, J., Ngansop, C., Makamche, F., Mbanya, D., Kaptué, L., Ndembi, N., Gürtler, L., et al. (2011). Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J. Virol.* *85*, 1403–1407.
- Van Duyne, R., Easley, R., Wu, W., Berro, R., Pedati, C., Klase, Z., Kehn-Hall, K., Flynn, E.K., Symer, D.E., and Kashanchi, F. (2008). Lysine methylation of HIV-1 Tat regulates transcriptional activity of the viral LTR. *Retrovirology* *5*, 40.

- Van Lint, C., Bouchat, S., and Marcello, A. (2013). HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* *10*, 67.
- Van Maele, B., Busschots, K., Vandekerckhove, L., Christ, F., and Debyser, Z. (2006). Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 98–105.
- 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.
- Van Nguyen, T., Angkasekwinai, P., Dou, H., Lin, F.-M., Lu, L.-S., Cheng, J., Chin, Y.E., Dong, C., and Yeh, E.T.H. (2012). SUMO-Specific Protease 1 Is Critical for Early Lymphoid Development through Regulation of STAT5 Activation. *Mol. Cell* *45*, 210–221.
- VanValkenburgh, J., Albu, D.I., Bapanpally, C., Casanova, S., Califano, D., Jones, D.M., Ignatowicz, L., Kawamoto, S., Fagarasan, S., Jenkins, N.A., et al. (2011). Critical role of Bcl11b in suppressor function of T regulatory cells and prevention of inflammatory bowel disease. *J. Exp. Med.* *208*, 2069–2081.
- Varadaraj, A., Mattoscio, D., and Chiocca, S. (2014). SUMO Ubc9 enzyme as a viral target. *IUBMB Life* *66*, 27–33.
- Vázquez, N., Greenwell-Wild, T., Marinos, N.J., Swaim, W.D., Nares, S., Ott, D.E., Schubert, U., Henklein, P., Orenstein, J.M., Sporn, M.B., et al. (2005). Human immunodeficiency virus type 1-induced macrophage gene expression includes the p21 gene, a target for viral regulation. *J. Virol.* *79*, 4479–4491.
- Venturini, L., You, J., Stadler, M., Galien, R., Lallemand, V., Koken, M.H., Mattei, M.G., Ganser, A., Chambon, P., Losson, R., et al. (1999). TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene* *18*, 1209–1217.
- Verdin, E., Paras, P., and Van Lint, C. (1993). Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *EMBO J.* *12*, 3249–3259.
- Verhofstede, C., Nijhuis, M., and Vandekerckhove, L. (2012). Correlation of coreceptor usage and disease progression. *Curr. Opin. HIV AIDS* *7*, 432–439.
- Verstraete, N., Kuzmina, A., Diribarne, G., Nguyen, V.T., Kobbi, L., Ludanyi, M., Taube, R., and Bensaude, O. (2014). A Cyclin T1 point mutation that abolishes positive transcription elongation factor (P-TEFb) binding to Hexim1 and HIV tat. *Retrovirology* *11*, 50.
- Vibholm, L., Schleimann, M.H., Højen, J.F., Benfield, T., Offersen, R., Rasmussen, K., Olesen, R., Dige, A., Agnholt, J., Grau, J., et al. (2017). Short-Course Toll-Like Receptor 9 Agonist Treatment Impacts Innate Immunity and Plasma Viremia in Individuals With Human Immunodeficiency Virus Infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *64*, 1686–1695.
- Vidya Vijayan, K.K., Karthigeyan, K.P., Tripathi, S.P., and Hanna, L.E. (2017). Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. *Front. Immunol.* *8*, 580.
- Vincent, K.A., York-Higgins, D., Quiroga, M., and Brown, P.O. (1990). Host sequences flanking the HIV provirus. *Nucleic Acids Res.* *18*, 6045–6047.

- Viswanath, N. (2016). Calculating the expected time to eradicate HIV-1 using a Markov Chain. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.*
- Vivet-Boudou, V., Didierjean, J., Isel, C., and Marquet, R. (2006). Nucleoside and nucleotide inhibitors of HIV-1 replication. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 163–186.
- Volk, J.E., Marcus, J.L., Phengrasamy, T., Blechinger, D., Nguyen, D.P., Follansbee, S., and Hare, C.B. (2015). No New HIV Infections With Increasing Use of HIV Preexposure Prophylaxis in a Clinical Practice Setting. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 61, 1601–1603.
- Wan, Z., and Chen, X. (2014). Triptolide inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting proteasomal degradation of Tat protein. *Retrovirology* 11, 88.
- Wang, C., Ivanov, A., Chen, L., Fredericks, W.J., Seto, E., Rauscher, F.J., and Chen, J. (2005). MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *EMBO J.* 24, 3279–3290.
- Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., and Das, A.T. (2016a). CRISPR-Cas9 Can Inhibit HIV-1 Replication but NHEJ Repair Facilitates Virus Escape. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 24, 522–526.
- Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., and Das, A.T. (2016b). A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Cultures. *Cell Rep.* 17, 2819–2826.
- Wang, Z., Pekarskaya, O., Bencheikh, M., Chao, W., Gelbard, H.A., Ghorpade, A., Rothstein, J.D., and Volsky, D.J. (2003). Reduced expression of glutamate transporter EAAT2 and impaired glutamate transport in human primary astrocytes exposed to HIV-1 or gp120. *Virology* 312, 60–73.
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Peng, W., Zhang, M.Q., et al. (2008). Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.* 40, 897–903.
- Wang, Z., Zhang, L.-J., Guha, G., Li, S., Kyrlykova, K., Kioussi, C., Leid, M., Ganguli-Indra, G., and Indra, A.K. (2012). Selective ablation of Ctip2/Bcl11b in epidermal keratinocytes triggers atopic dermatitis-like skin inflammatory responses in adult mice. *PloS One* 7, e51262.
- Warrilow, D., Tachedjian, G., and Harrich, D. (2009). Maturation of the HIV reverse transcription complex: putting the jigsaw together. *Rev. Med. Virol.* 19, 324–337.
- Wassarman, D.A., and Steitz, J.A. (1991). Structural analyses of the 7SK ribonucleoprotein (RNP), the most abundant human small RNP of unknown function. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3432–3445.
- Weeks, K.M., and Crothers, D.M. (1991). RNA recognition by Tat-derived peptides: Interaction in the major groove? *Cell* 66, 577–588.
- Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. (1995). Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375, 497–500.

- White, D., Rafalska-Metcalf, I.U., Ivanov, A.V., Corsinotti, A., Peng, H., Lee, S.-C., Trono, D., Janicki, S.M., and Rauscher, F.J. (2012). The ATM Substrate KAP1 Controls DNA Repair in Heterochromatin: Regulation by HP1 Proteins and Serine 473/824 Phosphorylation. *Mol. Cancer Res.* *10*, 401–414.
- Wilén, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012). HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*.
- Williams, S.A., Chen, L.-F., Kwon, H., Ruiz-Jarabo, C.M., Verdin, E., and Greene, W.C. (2006a). NF- κ B p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J.* *25*, 139–149.
- Williams, S.A., Chen, L.-F., Kwon, H., Ruiz-Jarabo, C.M., Verdin, E., and Greene, W.C. (2006b). NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J.* *25*, 139–149.
- Wilson, V.G. (2012). Sumoylation at the Host-Pathogen Interface. *Biomolecules* *2*, 203–227.
- Wires, E.S., Alvarez, D., Dobrowolski, C., Wang, Y., Morales, M., Karn, J., and Harvey, B.K. (2012). Methamphetamine activates nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and induces human immunodeficiency virus (HIV) transcription in human microglial cells. *J. Neurovirol.* *18*, 400–410.
- Wolf, D., and Goff, S.P. (2009). Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs. *Nature* *458*, 1201–1204.
- Wolf, D., Cammas, F., Losson, R., and Goff, S.P. (2008a). Primer binding site-dependent restriction of murine leukemia virus requires HP1 binding by TRIM28. *J. Virol.* *82*, 4675–4679.
- Wolf, D., Hug, K., and Goff, S.P. (2008b). TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of Lys1,2 tRNA-utilizing retroviruses in embryonic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 12521–12526.
- Wong, K., Sharma, A., Awasthi, S., Matlock, E.F., Rogers, L., Lint, C.V., Skiest, D.J., Burns, D.K., and Harrod, R. (2005). HIV-1 Tat Interactions with p300 and PCAF Transcriptional Coactivators Inhibit Histone Acetylation and Neurotrophin Signaling through CREB. *J. Biol. Chem.* *280*, 9390–9399.
- Wotton, D., Pemberton, L.F., and Merrill-Schools, J. (2017). SUMO and Chromatin Remodeling. In *SUMO Regulation of Cellular Processes*, (Springer, Cham), pp. 35–50.
- Wright, S., Lu, X., and Peterlin, B.M. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 tat directs transcription through attenuation sites within the mouse c-myc gene. *J. Mol. Biol.* *243*, 568–573.
- Wu, J., Lei, H., Zhang, J., Chen, X., Tang, C., Wang, W., Xu, H., Xiao, W., Gu, W., and Wu, Y. (2016). Momordin Ic, a new natural SENP1 inhibitor, inhibits prostate cancer cell proliferation. *Oncotarget* *7*, 58995–59005.
- Xiao, T.Z., Bhatia, N., Urrutia, R., Lomber, G.A., Simpson, A., and Longley, B.J. (2011). MAGE I transcription factors regulate KAP1 and KRAB domain zinc finger transcription factor mediated gene repression. *PLoS One* *6*, e23747.

- Xie, B., Invernizzi, C.F., Richard, S., and Wainberg, M.A. (2007). Arginine methylation of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by PRMT6 negatively affects Tat Interactions with both cyclin T1 and the Tat transactivation region. *J. Virol.* *81*, 4226–4234.
- Yadav, A., and Collman, R.G. (2009). CNS inflammation and macrophage/microglial biology associated with HIV-1 infection. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* *4*, 430–447.
- Yang, X.-J., and Chiang, C.-M. (2013). Sumoylation in gene regulation, human disease, and therapeutic action. *F1000Prime Rep.* *5*.
- Yang, Y., Fricke, T., and Diaz-Griffero, F. (2013a). Inhibition of reverse transcriptase activity increases stability of the HIV-1 core. *J. Virol.* *87*, 683–687.
- Yang, Y., Fiskus, W., Yong, B., Atadja, P., Takahashi, Y., Pandita, T.K., Wang, H.-G., and Bhalla, K.N. (2013b). Acetylated hsp70 and KAP1-mediated Vps34 SUMOylation is required for autophagosome creation in autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 6841–6846.
- Yang, Z., Yik, J.H.N., Chen, R., He, N., Jang, M.K., Ozato, K., and Zhou, Q. (2005). Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol. Cell* *19*, 535–545.
- Yang, Z., He, N., and Zhou, Q. (2008). Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 967–976.
- Yezid, H., Konate, K., Debaisieux, S., Bonhoure, A., and Beaumelle, B. (2009). Mechanism for HIV-1 Tat Insertion into the Endosome Membrane. *J. Biol. Chem.* *284*, 22736.
- Yik, J.H.N., Chen, R., Nishimura, R., Jennings, J.L., Link, A.J., and Zhou, Q. (2003). Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol. Cell* *12*, 971–982.
- Yik, J.H.N., Chen, R., Pezda, A.C., Samford, C.S., and Zhou, Q. (2004). A human immunodeficiency virus type 1 Tat-like arginine-rich RNA-binding domain is essential for HEXIM1 to inhibit RNA polymerase II transcription through 7SK snRNA-mediated inactivation of P-TEFb. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 5094–5105.
- Yoder, K.E., and Bushman, F.D. (2000). Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. *J. Virol.* *74*, 11191–11200.
- Yoon, C.-H., Jang, D.-H., Kim, K.-C., Park, S.Y., Kim, H.-Y., Kim, S.S., Chi, S.-G., and Choi, B.-S. (2014). Disruption of polycomb repressor complex-mediated gene silencing reactivates HIV-1 provirus in latently infected cells. *Intervirology* *57*, 116–120.
- Yukl, S.A., Shergill, A.K., Ho, T., Killian, M., Girling, V., Epling, L., Li, P., Wong, L.K., Crouch, P., Deeks, S.G., et al. (2013a). The distribution of HIV DNA and RNA in cell subsets differs in gut and blood of HIV-positive patients on ART: implications for viral persistence. *J. Infect. Dis.* *208*, 1212–1220.
- Yukl, S.A., Boritz, E., Busch, M., Bentsen, C., Chun, T.-W., Douek, D., Eisele, E., Haase, A., Ho, Y.-C., Hütter, G., et al. (2013b). Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative interventions: a study of the Berlin patient. *PLoS Pathog.* *9*, e1003347.

- Zagury, D., Lachgar, A., Chams, V., Fall, L.S., Bernard, J., Zagury, J.F., Bizzini, B., Gringeri, A., Santagostino, E., Rappaport, J., et al. (1998). Interferon alpha and Tat involvement in the immunosuppression of uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 3851–3856.
- Zeng, L., Yap, K.L., Ivanov, A.V., Wang, X., Mujtaba, S., Plotnikova, O., Rauscher, F.J., and Zhou, M.-M. (2008). Structural insights into human KAP1 PHD finger-bromodomain and its role in gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 626–633.
- Zhang, L., Vogel, W.K., Liu, X., Topark-Ngarm, A., Arbogast, B.L., Maier, C.S., Filtz, T.M., and Leid, M. (2012). Coordinated Regulation of Transcription Factor Bcl11b Activity in Thymocytes by the Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Pathways and Protein Sumoylation. *J. Biol. Chem.* *287*, 26971–26988.
- Zhang, L., Qin, J., Li, Y., Wang, J., He, Q., Zhou, J., Liu, M., and Li, D. (2014). Modulation of the stability and activities of HIV-1 Tat by its ubiquitination and carboxyl-terminal region. *Cell Biosci.* *4*, 61.
- Zhang, Z., Zhang, F., Yang, C., Qi, J., Gao, S., Li, S., Gu, Y., and Xia, N. (2016a). HIV-1 Capsid as a Target for Antiviral Therapy. *J. AIDS Clin. Res.* *7*, 1–6.
- Zhang, Z., Li, S., Gu, Y., and Xia, N. (2016b). Antiviral Therapy by HIV-1 Broadly Neutralizing and Inhibitory Antibodies. *Int. J. Mol. Sci.* *17*.
- Zhang, Z., Nikolai, B.C., Gates, L.A., Jung, S.Y., Siwak, E.B., He, B., Rice, A.P., O'Malley, B.W., and Feng, Q. (2017). Crosstalk between histone modifications indicates that inhibition of arginine methyltransferase CARM1 activity reverses HIV latency. *Nucleic Acids Res.* *45*, 9348–9360.
- Zhong, H., May, M.J., Jimi, E., and Ghosh, S. (2002). The Phosphorylation Status of Nuclear NF-KB Determines Its Association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* *9*, 625–636.
- Zhou, L., Sokolskaja, E., Jolly, C., James, W., Cowley, S.A., and Fassati, A. (2011). Transportin 3 promotes a nuclear maturation step required for efficient HIV-1 integration. *PLoS Pathog.* *7*, e1002194.
- Zhou, M., Deng, L., Lacoste, V., Park, H.U., Pumfery, A., Kashanchi, F., Brady, J.N., and Kumar, A. (2004). Coordination of Transcription Factor Phosphorylation and Histone Methylation by the P-TEFb Kinase during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription. *J. Virol.* *78*, 13522–13533.
- Zhou, Q., Li, T., and Price, D.H. (2012). RNA polymerase II elongation control. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 119–143.
- Zicari, S., Farley, K., Sun, L., Spurr, L., Dragon, A., Bukrinsky, M., Simon, G., Chauhan, A., and Tyagi, M. (2017). CBF-1 promotes the establishment and maintenance of HIV latency by recruiting Polycomb repressive complexes, PRC1 and PRC2, at HIV LTR. *BioRxiv* 174607.

Amina Ait Ammar

KAP1 : un nouveau facteur répresseur de la transcription du VIH-1

La latence post-intégrative du VIH-1 génère des réservoirs qui empêchent l'éradication du virus avec les thérapies actuelles. La compréhension des mécanismes moléculaires de la latence servirait à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de molécules de type LRA (Latency Reversing Agent) permettant la guérison fonctionnelle des patients et un arrêt des traitements. Nous avons démontré que la combinaison de deux types différents de LRAs à base de composés libérant P-TEFb (JQ1, I-BET, I-BET151 et HMBA) ou des agonistes de PKC (prostratine, bryostatine-1 et Ing-B) conduit à une robuste activation synergique de la production du VIH-1 dans divers modèles cellulaires de latence post-intégrative et dans des réservoirs de lymphocytes T CD4+ primaires. Le répresseur transcriptionnel CTIP2 recrute des complexes multienzymatiques pour favoriser l'établissement et la persistance de la latence du VIH-1 dans les cellules microgliales, le principal réservoir viral du système nerveux central. De plus, CTIP2 s'associe au complexe 7SK snRNP pour inhiber P-TEFb, un facteur d'élongation indispensable à l'expression du VIH-1 et à la réactivation des provirus latents. Des expériences d'immunoprécipitations de CTIP2, couplées à la spectrométrie de masse, nous ont permis d'identifier près de 900 partenaires protéiques de CTIP2. Parmi ces nouveaux partenaires, nous avons identifié la SUMO E3 ligase KAP1. Nous montrons que KAP1 réprime les phases précoce et tardive Tat dépendante de la transcription du VIH-1. KAP1 induit une dégradation de Tat, qui est sensible aux modulations de la voie SUMO. En effet, la sumoylation favorise l'association de Tat avec KAP1, de même que sa dégradation. Globalement, nos résultats suggèrent que KAP1 contribue à l'établissement et à la persistance des réservoirs latents du VIH-1. Cibler les voies SUMO constituerait un nouveau champ d'investigation dans le cadre du développement de nouvelles classes de LRAs.

Mots clés : VIH-1, latence, CTIP2, P-TEFb, KAP1, SUMO

KAP1: a new repressor factor for HIV-1 transcription

The HIV-1 post-integration latency generates reservoirs that prevent the eradication of the virus with the current therapies. The understanding of the molecular mechanisms of this latency enable the identification of new therapeutic targets and the development of LRA (Latency Reversing Agent) for functional cure and treatments interruption. We have demonstrated that the combination of two different LRAs based on P-TEFb releasing compounds (JQ1, I-BET, I-BET151 and HMBA) or PKC agonists (prostratin, bryostatin-1 and Ing-B) leads to robust synergistic activation of HIV-1 production in various cellular models of post-integration latency and in primary CD4+ T cells reservoirs. The transcriptional repressor CTIP2 recruits multienzymatic complexes to promote the establishment and persistence of HIV-1 latency in microglial cells, the main viral reservoir of the central nervous system. Furthermore, CTIP2 binds to the 7SK snRNP complex to inhibit P-TEFb, an elongation factor essential for HIV-1 expression and reactivation of latent proviruses. Immunoprecipitation experiments of CTIP2 coupled to mass spectrometry allowed us to identify almost 900 proteins partners of CTIP2. Among these new partners, we have identified the E3 SUMO ligase KAP1. We found that KAP1 contributes to HIV-1 gene silencing by repressing the initiation and the Tat-dependent steps of the viral gene transcription. KAP1 induces Tat degradation via a SUMO-sensitive pathway. Indeed, favoring the sumoylation promotes Tat association with KAP1 and the resulted Tat degradation. Altogether, our results suggest that KAP1 contributes to the establishment and the persistence of the latently infected HIV-1 reservoirs. Moreover, these results suggest that targeting the SUMO pathways may be a new field of investigation to develop new classes of LRAs for cure strategies.

Key words: HIV-1, latency, CTIP2, P-TEFb, KAP1, SUMO