

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé - ED414
UR 7292 – Dynamique des interactions hôte-pathogène

THÈSE présentée par :
Jeanne VAN ASSCHE
soutenue le : 17 Janvier 2022

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Discipline : Sciences du vivant
Spécialité : Virologie : Aspect Moléculaire et Santé

**Rôle des partenaires de CTIP2 dans la
latence post-intégrative du VIH-1
Importance de la voie SUMO**

THÈSE dirigée par :

M. ROHR Olivier
M. SCHWARTZ Christian

Professeur, Université de Strasbourg
Maitre de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. GALLOIS-MONTBRUN Sarah
M. GAUDIN Raphael

Chargée de Recherche, Institut Cochin - INSERM
Chargé de Recherche, IRIM - CNRS

EXAMINATEURS :

Mme. DIMITROVA Maria
Mme. MARBAN-DORAN Céline
M. HERBEIN Georges

Professeur, Université de Strasbourg
Principal Scientist, F. Hoffmann-La Roche
Professeur, Université de Franche-Comté

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres de mon jury, mes deux rapporteurs les Docteurs Sarah Gallois-Montbrun et Raphael Gaudin ainsi que mes trois examinateurs le Professeur Maria Dimitrova, le Docteur Céline Marban-Doran et le Professeur Georges Herbein, d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie mon directeur de thèse, Olivier Rohr de m'avoir accueillie dans son équipe. Merci pour sa confiance et merci pour toutes les opportunités qu'il m'a offertes pendant cette thèse. Elles m'ont énormément apporté tant sur le plan scientifique que personnel. Je remercie également mon co-directeur de thèse Christian Schwartz pour sa disponibilité, son aide et toutes les connaissances qu'il m'a m'apportées.

Je remercie tous les membres anciens et actuels du DHPI. Merci au Docteur Clémentine Wallet de m'avoir soutenue, aidée et écoutée. Merci à Fadoua, qui de nos premières années d'études supérieures jusqu'au laboratoire DHPI, est devenue bien plus qu'une collègue. Merci aux différents stagiaires du laboratoire qui m'ont aidée et qui ont participé à ce travail, Alexandre, Ceren et Aubin. Merci à Marco de m'avoir prise sous son aile à mon arrivée. Merci à Amina pour sa disponibilité et ses conseils. Enfin, merci à Morgane et Thomas pour leur aide.

Je remercie l'équipe du laboratoire CEPHR de l'University College Dublin, les Docteurs Paddy Mallon et Virginie Gautier ainsi qu'Alejandro de m'avoir accueillie à deux reprises. Je souhaite également remercier Vicki et Joe qui m'ont accueillie chez eux pendant mon séjour irlandais. Merci de m'avoir fait découvrir votre beau pays.

Merci à tout le personnel de l'IUT que j'ai côtoyé pendant ces trois années. Merci à Valérie et au service technique GB, Pascal, Dominique, Angélique et Valentina, toujours présents et disponibles pour nous aider et nous dépanner. À l'équipe gym IUT et en particulier Aurélie, merci pour les séances de sport.

Je souhaite remercier mes proches, mes amis et ma famille pour leur soutien précieux. Merci à mes grands-parents et mes frères. Merci à mes parents de m'avoir permis de mener des études qui m'ont conduite jusqu'à cette thèse. Enfin, je souhaite remercier Sébastien pour sa patience et son soutien sans faille. Maintenant c'est ton tour !

Table des matières

Remerciements	
Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux.....	
Liste des principales abréviations	
Introduction.....	1
1. Généralités	1
1.1. La découverte du VIH.....	1
1.2. L'origine du VIH.....	1
1.3. L'épidémiologie du VIH	2
1.4. Le déroulement de la maladie	3
2. Le cycle réplcatif du VIH-1	4
2.1. La particule virale	4
2.2. Le génome viral.....	5
2.3. L'organisation du promoteur du VIH-1.....	6
2.4. Le cycle de réplication du VIH-1.....	8
2.4.1. L'entrée du virus dans la cellule	9
2.4.2. La décapsidation et la transcription inverse	10
2.4.3. L'import dans le noyau	12
2.4.4. L'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte	14
2.4.5. L'expression du génome viral.....	16
2.4.6. L'assemblage, le bourgeonnement et la maturation.....	17
2.5. Le traitement du VIH-1	18
3. Les réservoirs	20
3.1. Les réservoirs cellulaires	22
3.1.1. Les lymphocytes T CD4 + mémoires	23
3.1.2. Les monocytes et les macrophages	25
3.1.3. Les cellules microgliales	26
3.2. Les réservoirs anatomiques	27
3.2.1. Le système nerveux central	27
3.2.2. Les tissus lymphoïdes associés aux intestins	28
3.3. Les conséquences de l'infection du SNC	28

4.	La latence post-intégrative du VIH-1	31
4.1.	La transcription du VIH-1 et Tat.....	32
4.1.1.	La transcription des gènes du VIH-1	32
4.1.2.	La protéine virale Tat	35
4.2.	Les mécanismes moléculaires de la latence post-intégrative du VIH-1.....	40
4.2.1.	L'établissement et le maintien de la latence dans les cellules microgliales 45	
4.3.	Les nouvelles stratégies de guérison	48
4.3.1.	La stratégie <i>Shock and Kill</i>	49
4.3.2.	La stratégie <i>Block and Lock</i>	50
4.3.3.	La thérapie génique	50
4.3.4.	Les limites de ces stratégies	51
5.	La SUMOylation	53
5.1.	Le mécanisme de SUMOylation et les enzymes associées	53
5.1.1.	Le cycle de SUMOylation	53
5.1.2.	L'enzyme E2 de conjugaison	55
5.1.3.	Les SENP.....	55
5.2.	Les motifs de SUMOylation.....	56
5.2.1.	Les sites consensus de SUMOylation.....	56
5.2.2.	Les SIM : motifs d'interaction SUMO.	58
5.3.	Les protéines SUMO et la formation de chaînes SUMO	60
5.3.1.	Les isoformes SUMO	60
5.3.2.	Les modifications post-traductionnelles des protéines SUMO	61
5.4.	Les chaînes SUMO, l'ubiquitination et la dégradation protéasomale	62
5.4.1.	Les chaînes SUMO	62
5.4.2.	Les STUbL et RNF4.....	63
5.4.3.	La SUMOylation comme signal pour la dégradation des protéines par la voie du protéasome	64
5.5.	Les effets de la SUMOylation	65
5.5.1.	La modulation des complexes répresseurs ou activateurs de la transcription par la SUMOylation.....	66
5.5.2.	La compétition entre l'acétylation ou la phosphorylation avec la SUMOylation	67

5.5.3. La modulation de l'association des facteurs de transcription à l'ADN par la SUMOylation	68
5.5.4. La SUMOylation, les histones et la chromatine	69
5.6. La SUMOylation et le VIH	71
6. Objectifs de thèse	77
Résultats	79
1. Publication n°1	79
2. Publication n°2	90
3. Publication n°3	106
4. Publication n°4 (en préparation)	123
Discussion	143
Matériel et Méthodes	154
1. Matériels	154
1.1. Lignées cellulaires	154
1.2. Vecteurs plasmidiques	154
1.3. Amorces et sondes utilisées en qPCR	154
2. Méthodes	155
2.1. Acides nucléiques	155
2.1.1. Quantification des acides nucléiques	155
2.1.2. Électrophorèse des acides nucléiques	155
2.2. Méthodes d'étude de l'ARN	155
2.2.1. Extraction des ARN totaux	155
2.2.2. Traitement DNases	156
2.2.3. Rétro-transcription des ARN en ADNc	157
2.3. Méthodes d'étude de l'ADN	157
2.3.1. Production et préparation des vecteurs plasmidiques	157
2.3.2. Extraction de l'ADN total	157
2.3.3. qPCR	158
2.3.4. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	159
2.3.5. Essais luciférase	161
2.4. Méthodes d'étude des protéines	161
2.4.1. Extraction des protéines	161
2.5. Quantification des protéines	162
2.5.1. Quantification des protéines par la méthode de Bradford	162

2.5.2.	Quantification par la méthode BCA	163
2.5.3.	Électrophorèse SDS-PAGE et western blot	163
2.5.4.	Immunoprécipitation des protéines	164
2.6.	Méthodes de transfection	165
2.6.1.	Transfection des cellules HEK293T	165
2.6.2.	Transfection des cellules microgliales	166
2.7.	Méthode d'étude des cellules	167
2.7.1.	Microscopie	167
2.7.2.	Cytométrie en flux	168
2.7.3.	Test de survie cellulaire	171
	Bibliographie.....	172
	Annexes.....	195
	Annexe 1 : Protocole SARS-CoV-2	195
	Annexe 2 : Publication SARS-CoV-2.....	203
	Résumé	216
	Abstract	216

Liste des figures

Figure 1 : Graphique de l'évolution du nombre de personnes infectées par le VIH-1 dans le monde de 1990 à 2017 (ONUSIDA 2019).	3
Figure 2 : Évolution de la maladie en trois phases, primo-infection, asymptomatique et SIDA (Simon and Ho, 2003).	4
Figure 3 : Représentation schématique de la particule du VIH-1 (Kenneth, 2011).	5
Figure 4 : Organisation génomique du VIH-1 (adapté de (Nkeze et al., 2015)).....	6
Figure 5 : Promoteur du VIH-1.....	7
Figure 6 : Cycle réplcatif du VIH-1 (Barré-Sinoussi et al., 2013).....	9
Figure 7 : Mécanisme d'entrée du virus dans la cellule (Wilen et al., 2012)	10
Figure 8 : Mécanisme d'entrée du génome viral dans le noyau puis intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte (Lusic and Siliciano, 2017).	13
Figure 9 : Mécanisme de l'intégration de l'ADN viral par l'intégrase (Lusic and Siliciano, 2017)	15
Figure 10 : Mécanismes d'assemblage, de bourgeonnement et de maturation des virions nouvellement synthétisés (Freed, 2015).	18
Figure 11 : Évolution de la charge virale au cours du temps et en fonction de l'observance du traitement (Van Lint et al., 2013).	19
Figure 12 : Persistance du VIH et latence virale (Dufour et al., 2020).	21
Figure 13 : Contribution des sous-types de cellules T CD4+ au réservoir du VIH sous cART selon leur état de mémoire (en haut) ou selon leurs fonctions effectrices (en bas) (Kulpa and Chomont).	24
Figure 14 : Mécanisme d'entrée du VIH-1 dans le SNC (pour revue (Gras and Kaul, 2010)).....	26
Figure 15 : Classification des HAND selon les critères de Frascati (d'après (Sutherland and Brew, 2018)).....	29
Figure 16 : Facteurs pouvant induire les atteintes neurocognitives retrouvées chez les personnes vivant avec le VIH (Sutherland and Brew, 2018).	30
Figure 17 : Mécanismes de la transcription du VIH-1 (d'après (Bouchat and Lint, 2019)).....	32
Figure 18 : Représentation de Tat et des 6 domaines qui le composent (Li et al., 2012a)	36

Figure 19 : Positionnement des modifications post-traductionnelles de Tat (Hetzer et al., 2005)	38
Figure 20 : Mécanismes de la latence virale et cibles thérapeutiques possibles (Dufour et al., 2020).	41
Figure 21 : Structure de la protéine CTIP2 et domaines de liaison aux protéines impliquées dans la latence virale (d'après (Le Douce et al., 2014)).	46
Figure 22 : Complexes recrutés au niveau du promoteur du VIH-1 permettant l'établissement et le maintien de la latence virale dans les cellules microgliales (Wallet et al., 2019).	47
Figure 23 : Fonctionnement des trois nouvelles stratégies pour éliminer ou réduire les réservoirs viraux (Wallet et al., 2019).	49
Figure 24 : Mécanisme de la SUMOylation (Imbert and Langford, 2021).	54
Figure 25 : Domaines d'interactions d'UBC9	55
Figure 26 : Mécanismes de fonctionnement des SIM (Hendriks and Vertegaal, 2016)	59
Figure 27 : La modification des protéines SUMO par d'autres modifications post-traductionnelles.	62
Figure 28 : Domaines qui composent RNF4 (Staudinger, 2017)	64
Figure 29 : Modulation de l'activité des facteurs de transcription par la SUMOylation (Rosonina et al., 2017).	65
Figure 30 : Mécanismes de répression de la transcription par la SUMOylation des histones (Ryu and Hochstrasser, 2021).	70
Figure 31 : Effets de la SUMOylation sur les facteurs cellulaires impliqués dans la réplication du VIH (Colomer-Lluch et al., 2019).	72
Figure 32 : Schéma du protocole pour les traitements des cellules CHME5-HIV avec les différentes molécules pour les expériences de réactivation en cytométrie en flux.	170
Figure 33 : Méthode de cytométrie en flux utilisée pour analyser les expériences de réactivation (CHME5-HIV).	171

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des différentes SENP avec leurs localisations cellulaires et leurs fonctions (d'après (Hickey et al., 2012)).	56
Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées en qPCR.....	154
Tableau 3 : Exemple de composition du mélange réactionnel pour la qPCR	159
Tableau 4 : Molécules testées lors des expériences de cytométrie en flux sur le modèle de cellules microgliales infectées latentes par le VIH-1.....	170

Liste des principales abréviations

aa	Acide Aminé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA-Editing enzyme Catalytic polypeptide-like 3G
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ARN Pol II	ARN polymérase II
ARV	Antirétroviraux
ASP	Anti-Sens Protein
AZT	Azidothymidine
BCL11b	B-cell lymphoma/leukemia 11b
BHE	Barrière hématoencéphalite
BSA	Bovine Serum Albumin
CA	Capside
CaCl₂	Chlorure de calcium
cART	Combination Antiretroviral Therapy
CCR5	Chemokine (CC motif) Receptor 5
CD4 ou 8	Cluster de Différenciation 4 ou 8
Cdk9	Cyclin-dependent kinase 9
ChIP	Immunoprécipitation de la Chromatine
CO₂	Dioxyde de carbone
CPSF6	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 6
CTD	C-terminal Domain
Cter	Carboxy-terminale
CTIP2	Chicken ovalbumin upstream promoter Transcription factor-Interacting Protein 2
CXCR4	Chemokine (CXC motif) Receptor 4
dCA	Didehydro-Cortistatin A
DH5α	Douglas Hanahan 5 alpha
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde

DNases	Desoxyribonucléase
DNA-PKcs	DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonucléotides
DSIF	DRB Sensitivity Inducing Factor
DTT	Dithiothréitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
FT	Facteur de transcription
FSC	Forward Scatter
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFP	Green Fluorescent Protein
gp120/41	Glycoprotéine 120/41
HAD	HIV-associated dementia ou démences associées au VIH
HAND	HIV-Associated Neurocognitive Disorder ou Troubles neurocognitifs associés au VIH
HAT	Histone Acetyl Transferase
HCSM	Hydrophobic Cluster Sumoylation Motif
HDAC	Histone Deacetylase
Hdm2	Human double minute 2
HEK 293T	Human embryonic kidney cell line 293 T
HEXIM1	Hexamethylene bisacetamide inducible 1
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1
HMGA	High Mobility Group A
HMT	Histone Methyl Transferase
HP1	Heterochromatin protein 1
HTLV	Human T-Lymphotropic Virus
H4	Histone 4
IFN	Interferon
IN	Intégrase
INI1	Integrase Interactor 1

IP	Immunoprécipitation
IkBα	Inhibitor of kB α
K	Lysine
KAP1	KRAB (Krüppel-Associated Box) domain-Associated Protein 1
LAV	Lymphoadenopathy-associated virus
LB	Lysogeny broth
LEDGF	Lens epithelium–derived growth factor
LPA	Latency Promoting Agents
LRA	Latency Reversing Agent
LSD1	Lysine-Specific histone Demethylase 1A
LT	Lymphocyte T
LTC	Lymphocyte T cytotoxique
LTR	Long Terminal Repeat
Lys	Lysine
MA	Matrice
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5Diphenyltetrazolium Bromide
NC	Nucléocapside
NDSM	Negatively Charged Amino Acid-Dependent Sumoylation Motif
Nef	Negative regulatory factor
NELF	Negative elongation factor
NES	Nuclear Export Signal
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NF-kB	Nuclear Factor-kB
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
NMDAR	N-methyl-D-Aspartate receptors
NLS	Nuclear Localization Sequence
NPC	Nuclear Pore Complex
Nuc	Nucléosome
Nup153/358	Nucléoporine 153/358
NuRD	Nucleosome Remodeling and Deacetylation
PBMC	Cellules mononucléées sanguines périphériques

PBS	Primer Bonding Region
PCAF	p300/CBP-Associated Factor
PCR	Polymerase chain reaction
PDSM	Phosphorylation-Dependent Sumoylation Motif
PEI	Polyethylenimine
PFA	Paraformaldehyde
PIC	Pre-Intregation Complex
PML	Promyelocytic leukemia protein
PMSF	Fluorure de phénylméthanesulfonyle
Pol	Polymerase
PR	Protéase
PTEF- b	Positive transcription elongation factor
PTM	Post-translational modification ou modification post-traductionnelle
PV	Particule Virale
RanBP	Ran (Ras-related nuclear protein 1) Binding Protein
RanGAP	Ran GTPase (Guanosine Triphosphate hydrolase) Activating Protein
Rev	Regulator of virion expression
RF	Rouge de Phenol
RNase	Ribonuléase
RNF4	Ubiquitine E3 ligase ring-finger 4
RRE	Rev Responsive Element
RT	Rétrotranscription ou rétrotranscriptase
RTC	Reverse Transcription complex
SAE	SUMO-activating enzyme
SAMHD1	Sterile Alpha Motif And HD Domain Containing Deoxynucleoside Triphosphate Triphosphohydrolase 1
SCM	SUMO consensus motif
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEC	Super elongation complex
SENp	Sentrin-specific protease
sh	Short haipin
SI	Système Immunitaire
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise

SIM	Motifs d'interaction SUMO
SIRT1	Sirtuin 1
SIV	Virus d'immunodéficience simienne
SNC	Système nerveux central
Sp1	Specificity Protein 1
SSC	Side Scatter
STUbL	SUMO-targeted ubiquitin E3 ligases
suH4	Histone 4 sumoylé
SUMO	Small ubiquitin like modifier
SUV39H1	Suppressor of variegation 3-9 homolog 1
TAR	Trans-activation response element
Tat	Transactivator of transcription
TBP	TATA-binding protéine
TCR	T Cell Receptor
Tfh	T follicular helper cells
Th17	T Helper 17
TNPO3	Transportin 3
TRIM 5α	Tripartite Motif 5 α
T_{CM}	Central Memory T Cell
T_{TM}	Transitional Memory T Cell
T_{EM}	Effector Memory T Cell
T_N	Naïve T Cell
T_{TD}	Terminal Differentiated T Cell
T_{scM}	Stem cell-like memory T Cell
UBC9	Ubiquitin-like conjugating enzyme 9
USPL1	Ubiquitine-specific protease-like 1
Vif	Viral infectivity factor
VIH-1	Virus de l'Immunodéficience Humaine 1
Vpr	Viral protein r
Vpu	Viral protein u
WB	Western blot
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Introduction

1. Généralités

1.1. La découverte du VIH

La longue histoire du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) débute à la fin des années 1970 aux États-Unis par une augmentation anormale des cas de pneumonie à *Pneumocystis carinii* et de syndrome de Kaposi chez de jeunes patients. D'autres cas sont rapidement identifiés dans le reste du monde. C'est le point de départ de l'une des pandémies les plus dévastatrices actuellement identifiées. Cette maladie caractérisée par une forte immunodépression et une atteinte des cellules du système immunitaire sera par la suite renommée syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA).

En 1983, un nouveau rétrovirus est identifié par l'Institut Pasteur de Paris, le lymphoadenopathy-associated virus (LAV). Ce rétrovirus humain, ayant pour cible principale les lymphocytes est isolé à partir de ganglions lymphatiques d'un patient souffrant de lymphadenopathies (Barré-Sinoussi et al., 1983). Cependant, le lien entre le SIDA et ce virus n'est pas encore clairement établi. En 1984, le Center for Disease Control (CDC), à l'origine de l'alerte sanitaire en 1981 annonce que les États-Unis ont également identifié un nouveau rétrovirus. Il est isolé de patients présentant des symptômes du SIDA et est appelé HTLV-III. Le CDC indique qu'il est fort probable que ce virus soit la cause du SIDA (Gallo et al., 1984). Finalement, il s'est avéré que le LAV et le HTLV-III sont identiques et qu'il s'agit de l'agent étiologique du SIDA. Ce virus sera rebaptisé en 1986 : Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Les deux chercheurs de l'Institut Pasteur de Paris et principaux acteurs de la découverte du VIH-1, Françoise Barré-Sinoussi et Luc Montagnier ont reçu le Prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 2008 pour leur découverte.

1.2. L'origine du VIH

Par la suite, deux souches de VIH ont été identifiées. Le VIH-1 est le principal agent étiologique du SIDA puisqu'il représente 98% des infections VIH dans le monde.

Une deuxième souche de VIH a été identifiée en 1986, le VIH-2 (Clavel et al., 1986). Elle est moins virulente et ne représente donc que 2% des infections dans le monde. L'analyse génétique des souches du VIH-1 a mis en évidence l'immense diversité de ce virus. Le VIH-1 se divise en 4 principaux groupes : M (Major), O (Outlayer), N (New) et enfin P. Les virus VIH-1 du groupe M sont les virus les plus largement répandus et sont responsables de la pandémie actuelle. Il existe ensuite des sous-types et certains de ces sous-types se recombinent entre eux pour donner des formes recombinantes du virus. Cette diversité génétique varie aussi en fonction des zones géographiques. Les virus des groupes O, N et P restent concentrés au Cameroun et dans les pays voisins ((Faria et al., 2014).

Les analyses phylogénétiques ont permis d'établir que l'infection de l'Homme par le VIH provient d'une zoonose du SIV (Simian Immunodeficiency Virus) (Sharp et al., 2001). Les souches VIH-1 du groupe M et N sont originaires du SIV des chimpanzés communs (SIVcpz) ou Pan troglodytes troglodytes (Keele et al., 2006) (Van Heuverswyn et al., 2007). Les souches VIH-1 du groupe O et P sont originaires du SIV des gorilles (SIVgor) ou Gorilla gorilla gorilla (Neel et al., 2010) tandis que le VIH-2 est lui originaire du SIV des singes mangabey fuligineux (SIVmm) ou Cercocebus atys. Une étude sur l'origine et la dissémination du VIH-1 publiée dans la revue *Science* en 2014 confirme que le virus est originaire d'Afrique et plus précisément de l'actuelle République Démocratique du Congo (RDC). Il aurait émergé dans la ville de Kinshasa aux alentours des années 1920 et se serait propagé grâce aux réseaux de transport ferroviaire et fluvial qui étaient alors en plein essor. Il aurait ensuite été disséminé vers Haïti par le biais de travailleurs haïtiens venus travailler en RDC. Puis le virus a été transporté aux États-Unis (Faria et al., 2014).

1.3. L'épidémiologie du VIH

Depuis la découverte du virus, 34,7 millions de personnes sont décédées de maladies liées à l'infection par le VIH. En 2020, 37,6 millions de personnes sont infectées par le VIH dont plus de deux tiers en Afrique Sub-saharienne (Figure 1). La couverture par le traitement cART (Combination Antiretroviral Therapy) est de 73% mais 1,5 million de nouvelles infections ont tout de même été dénombrées.

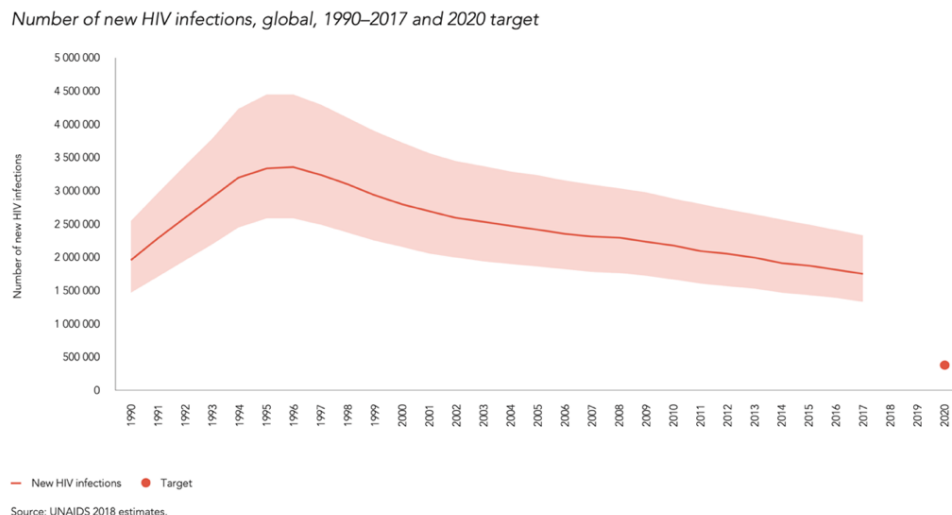


Figure 1 : Graphique de l'évolution du nombre de personnes infectées par le VIH-1 dans le monde de 1990 à 2017 (ONUSIDA 2019).

1.4. Le déroulement de la maladie

L'évolution clinique de l'infection par le VIH-1 en l'absence de traitement peut être divisée en trois phases (Figure 2). La phase primaire de l'infection par le VIH-1 dure entre 3 et 6 mois et est généralement associée à un syndrome grippal. Elle présente un pic de virémie dans les deux semaines suivant la transmission. Puis, la virémie diminue à mesure que la réponse immunitaire spécifique au VIH-1 se développe, c'est la phase chronique de l'infection. Une fois la virémie plasmatique stabilisée, le nombre de lymphocytes T CD4 + (LTCD4+) retrouve des niveaux acceptables après avoir subi une importante baisse lors de la première phase de l'infection. La phase chronique ou asymptomatique présente une durée variable selon les individus. Pendant cette phase, la réplication virale ne s'interrompt pas. Cette réplication à bas bruit maintient le système immunitaire (SI) actif, induit une inflammation chronique qui l'affaiblit et enclenche une baisse progressive des niveaux de LTCD4+. La phase SIDA est caractérisée par l'apparition de maladies et d'infections opportunistes dues à l'épuisement du SI (nombre LTCD4+ < 200 par mm³) qui ne peut plus combattre les agents pathogènes (pour revue (International AIDS Society Scientific Working Group on HIV Cure et al., 2012; Lederman and Margolis, 2008; Simon and Ho, 2003)).

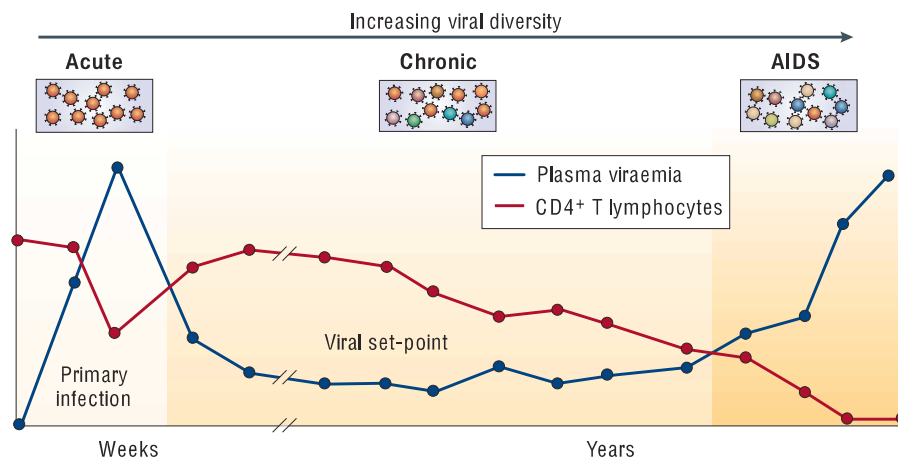


Figure 2 : Évolution de la maladie en trois phases, primo-infection, asymptomatique et SIDA (Simon and Ho, 2003).

2. Le cycle réplcatif du VIH-1

2.1. La particule virale

Le VIH-1 est un lentivirus, du latin *lentus* en raison de la lente évolution de l'infection. Ces virus peuvent se répliquer pendant plusieurs années avant l'apparition de signes de la maladie par épuisement du système immunitaire. Ces lentivirus sont de la famille des rétrovirus car ils ont la particularité de devoir rétrotranscrire leur génome ARN en ADN. Le VIH-1 est un virus enveloppé de 80 à 120 nm. Son génome est sous la forme de deux molécules d'ARN monocaténares de polarité positive. La particule virale (PV) (Figure 3) possède une enveloppe virale composée d'une bicouche lipidique provenant de la cellule de laquelle il a bourgeonné. Ancrées à sa surface, les deux glycoprotéines, gp41 et gp120 permettent l'entrée de la particule virale dans les cellules. À l'intérieur de l'enveloppe se trouvent la matrice (p17), la capsid conique (p24), et la nucléocapside (p7) (Kenneth, 2011). Dans le cœur viral, se trouvent les deux molécules d'ARN simple brin ainsi que les trois enzymes virales : la protéase, l'intégrase et la transcriptase inverse. Ces dernières sont nécessaires aux premières étapes du cycle viral. Des protéines cellulaires provenant de la cellule d'où a bourgeonné le virus et des protéines virales comme Vpr, Vif et Nef sont également intégrées dans la particule virale. Le précurseur Gag orchestre l'assemblage du virion immature ainsi que d'importants réarrangements structuraux pour former des virions matures et infectieux. Les particules virales qui bourgeonnent des cellules hôtes sont initialement sous forme non infectieuse. Le précurseur Gag

composé des trois domaines structuraux majeurs MA (matrice), CA (capside) et NC (nucléocapside) doit être clivé par la protéase virale contenue dans la PV pour que cette même PV devienne mature. La matrice reste attachée à l'enveloppe virale. La nucléocapside s'assemble avec le génome viral et les trois enzymes virales pour former le complexe ribonucléoprotéique. Enfin, les protéines de capsid s'assemblent pour former la capsid conique autour du complexe ribonucléoprotéique génomique (pour revue (Ganser-Pornillos et al., 2012)).

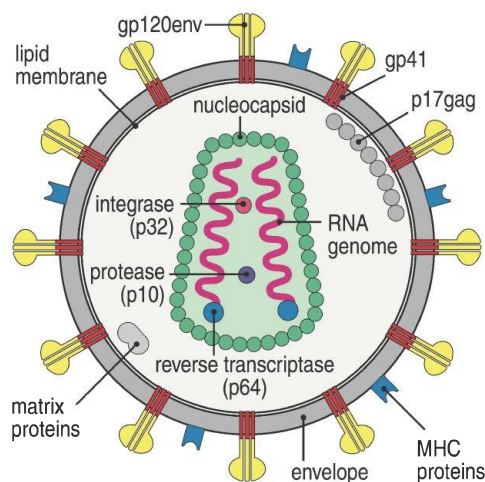


Figure 3 : Représentation schématique de la particule du VIH-1 (Kenneth, 2011).

2.2. Le génome viral

Le génome viral est composé de deux simples brins d'ARN de polarité positive faisant chacun 9,7 kb. Ces brins seront rétrotranscrits en brin d'ADN par la transcriptase inverse virale. Le brin d'ADN néosynthétisé est flanqué de deux régions identiques appelées LTR (Long Terminal Repeat) à chacune de ses extrémités 5' et 3'. Ils permettent notamment l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte. Le LTR positionné en 5' du brin d'ADN exerce également la fonction de promoteur viral.

Le génome viral (Figure 4) contient neuf gènes viraux dont *gag*, *pol* et *env* qui codent pour des polyprotéines. Les polyprotéines seront ensuite clivées en protéines par la protéase virale pour les précurseurs Gag et Pol et par une protéase cellulaire pour Env. *Gag* code pour les protéines de capsid, de matrice et de nucléocapside. *Pol* code pour les enzymes virales et *env* code pour les glycoprotéines de surface gp120

et gp41. Le génome du VIH-1 contient également les gènes qui codent pour les protéines régulatrices Tat et Rev et les protéines dites accessoires Nef, Vif, Vpr et Vpu (Frankel and Young, 1998). Cependant, de nombreuses études ont par la suite démontré l'importance de ces protéines dans la répression des facteurs de restriction cellulaires (Forouzanfar et al., 2019; Wallet et al., 2020). L'existence d'un gène présent sur le brin anti-sens du génome du VIH-1 nommé *asp* qui coderait pour la protéine ASP (Anti-Sens Protein) a été démontrée. Cette protéine pourrait avoir un rôle dans la latence virale mais aussi dans la dérégulation du système immunitaire (Cassan et al., 2016; Miller, 1988).

Le génome du VIH-1 possède également des régions non-codantes, les LTR (Long Terminal Repeat) composées de plusieurs régions (U3, U5, R, TAR) et le RRE (Rev Responsive Element). Ce dernier est retrouvé dans les séquences codantes du VIH-1, il permet la fixation de la protéine virale Rev (Sierra et al., 2005).

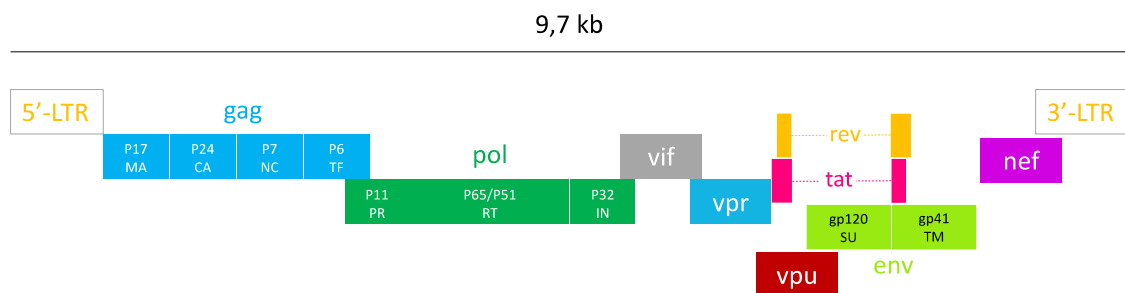


Figure 4 : Organisation génomique du VIH-1 (adapté de (Nkeze et al., 2015))

2.3. L'organisation du promoteur du VIH-1

Le VIH-1 possède deux LTR situés respectivement aux extrémités 5' et 3' du génome viral. Ils peuvent tous les deux initier la transcription mais c'est le LTR situé en 5' qui sert préférentiellement de promoteur (Figure 5) (Cullen et al., 1984).

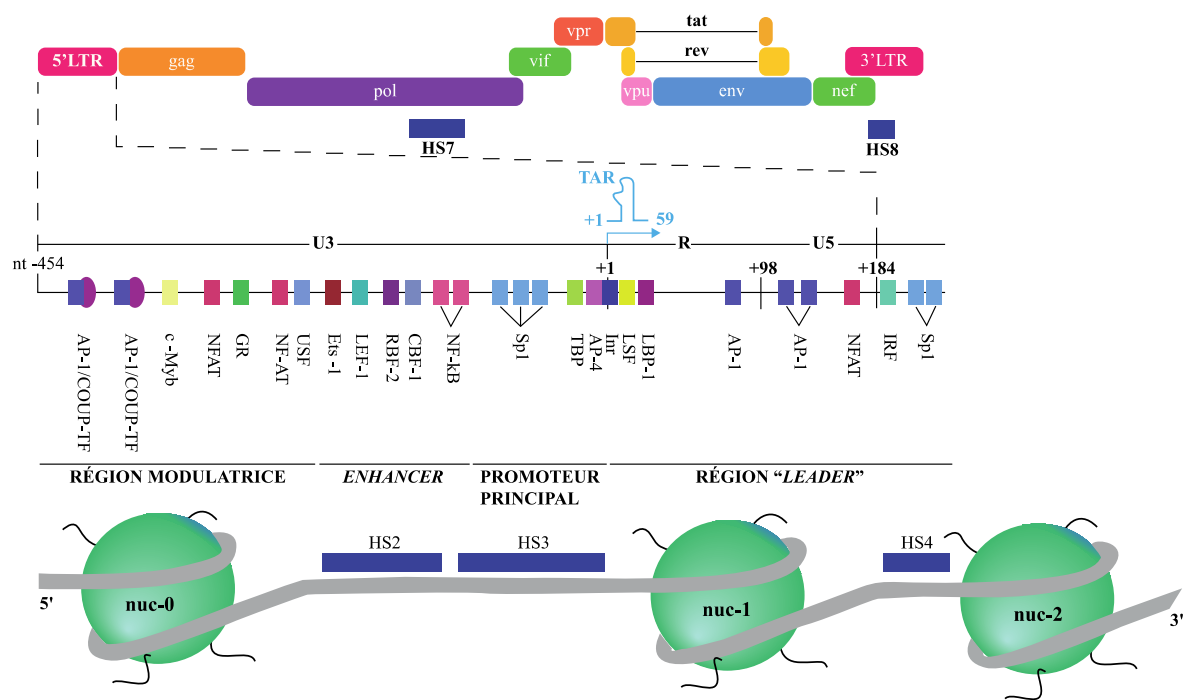


Figure 5 : Promoteur du VIH-1.

Représentation des différentes régions qui constituent le promoteur, des facteurs de transcription qui s'y lient et de son organisation autour des nucléosomes (Bouchat and Lint, 2019).

Le LTR 5' est situé entre les nucléotides -454 et +188 par rapport au site d'initiation de la transcription. Le promoteur du VIH-1 est divisé en trois régions U3, R et U5. Dans ces régions, 4 domaines fonctionnels sont retrouvés.

- La région régulatrice située entre les nucléotides -454 à -104 : cette région permet la fixation de certains facteurs de transcription.
- L'élément enhancer situé entre les nucléotides -105 à -79 : cette région possède deux sites de liaison pour le facteur de transcription NF-κB essentiel à la transcription des gènes.
- Le promoteur minimal situé entre les nucléotides -78 à -1 : il contient la boîte TATA et 3 sites de liaison pour les facteurs Sp1.

Ces 3 domaines sont retrouvés dans la région U3 du promoteur viral.

- La région TAR située entre les nucléotides +1 à +60 : elle permet de former une structure ARN en tige boucle reconnue par Tat et nécessaire à son activité d'amplification de la transcription des gènes viraux.

Ce dernier domaine se situe dans la région R du promoteur viral.

Le promoteur central contient les éléments essentiels pour l'activité basale du promoteur du VIH-1 :

- La boîte TATA (Garcia et al., 1989)
- Trois sites de liaison riches en GC en tandem pour la liaison des facteurs de transcription Sp (Jones et al., 1986).
- Un site d'initiation de la transcription (TSS) non conventionnel très actif (Zenzie-Gregory et al., 1993).

La boîte TATA et les sites de liaison des Sp sont essentiels pour initier la transcription et pour l'activité basale du promoteur (Jones and Peterlin, 1994). À l'extrémité du LTR 5' se trouvent les sites de fixation de différents facteurs de transcription comme AP-1, NFAT, IRF, et Sp1. La transcription débute dans la région R du LTR 5', les transcrits sont ensuite coiffés et allongés. En fin de transcription, le signal de polyadénylation (poly(A)), codé par la région U5 du LTR 3' est ajouté (pour revue (Ne et al., 2018)).

Le promoteur du VIH-1 s'organise autour de deux nucléosomes dont la position ne varie pas :

- Nuc-0 (-415/-255)
- Nuc-1 (+10/+155)

(pour revue (Bouchat and Lint, 2019) (Stevens et al., 2006)).

2.4. Le cycle de réplication du VIH-1

L'infection par le VIH-1 est caractérisée par un épuisement du système immunitaire puisque ce virus infecte de nombreuses cellules appartenant au SI. Le VIH-1 a pour principale cible les lymphocytes T CD4 +, les cellules dendritiques et les macrophages. Le cycle de réplication du virus (Figure 6) est classiquement défini par 13 étapes qui vont de l'entrée du virus dans la cellule cible au bourgeonnement d'une nouvelle particule virale infectieuse.

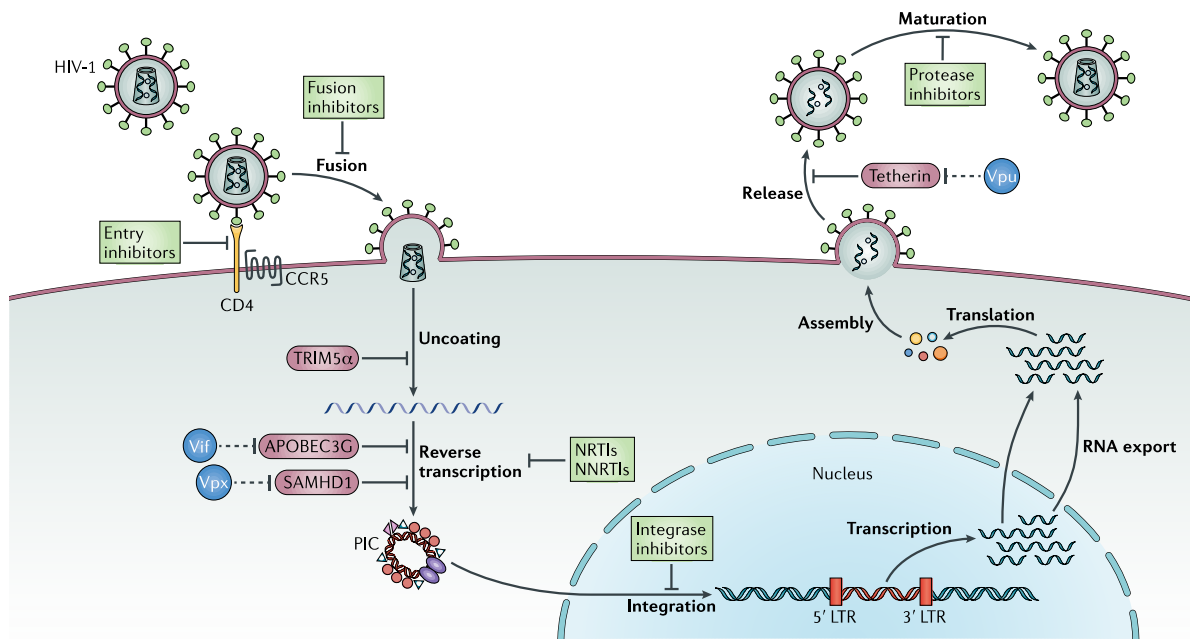


Figure 6 : Cycle réplcatif du VIH-1 (Barré-Sinoussi et al., 2013)

Principales étapes qui composent le cycle ainsi que les stratégies mises en œuvre par la cellule pour lutter contre l'infection (rouge), les stratégies virales mise en place par le virus pour lutter contre les mécanismes cellulaires antiviraux (bleu) et les différentes molécules thérapeutiques utilisées actuellement (vert).

2.4.1. L'entrée du virus dans la cellule

La première étape du cycle viral est l'entrée du virus dans la cellule hôte (Figure 7). Celle-ci est médiée par la protéine virale de surface Env formée de trois hétérodimères gp120-gp41. Pour permettre l'entrée du virus, la gp120 virale reconnaît tout d'abord le récepteur CD4 de la cellule cible. Puis sa boucle V3 se lie à l'un des corécepteurs cellulaires CCR5 ou CXCR4. Cette interaction permet à la région N-terminale hydrophobe de la gp41 aussi appelée peptide de fusion de s'enchâsser dans la membrane de la cellule hôte aboutissant finalement à la fusion (Tagliamonte et al., 2011). L'entrée du virus par l'un des deux corécepteurs CCR5 ou CXCR4 définit son tropisme. Les virus qui entrent dans les cellules hôte via les récepteurs CCR5 sont dits de tropisme R5. Ceux qui utilisent le corécepteur CXCR4 sont dits de tropisme X4. Enfin, on retrouve des virus qui sont de tropisme X4R5, c'est à dire qu'ils peuvent entrer dans les cellules via les deux corécepteurs (Iwamoto et al., 2010). La boucle V3 de la gp120 détermine principalement le tropisme viral (Hwang et al., 1991; O'Brien et al., 1990; Shioda et al., 1991). Les acides aminés de cette boucle dans les souches X4 ont une charge positive significativement plus élevée que pour les souches virales

R5 (Fouchier et al., 1992). Le tropisme viral varie selon l'évolution de l'infection, la phase initiale étant caractérisée par la présence majoritaire de virus à tropisme R5 alors que les souches X4 apparaissent plus tard avec la progression de l'infection.

L'étape d'entrée du virus dans la cellule est déterminante pour la suite de l'infection. Une délétion de 32 paires de bases dans le gène qui code pour le récepteur CCR5 conduit à une absence totale du récepteur à la surface cellulaire. Les individus avec une délétion homozygote CCR5 Δ 32 sont par conséquent protégés contre l'infection par le VIH-1 (Samson et al., 1996).

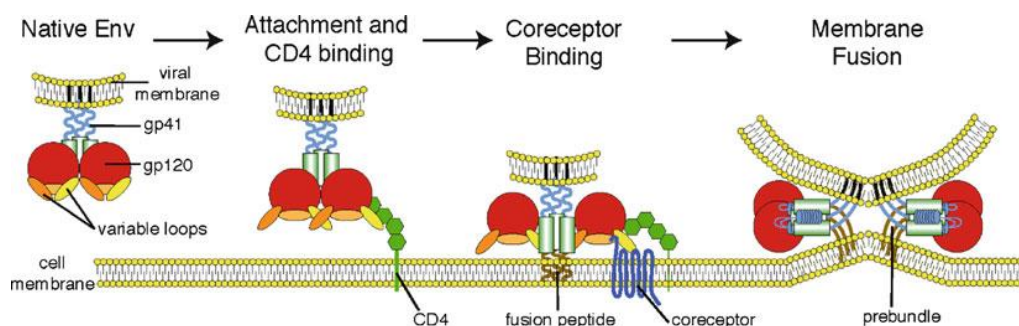


Figure 7 : Mécanisme d'entrée du virus dans la cellule (Wilén et al., 2012)

2.4.2. La décapsidation et la transcription inverse

Une fois l'étape d'entrée effectuée et après avoir été libéré dans le cytoplasme, le virus est pris en charge par le réseau de microtubules pour être acheminé vers le noyau (Dharan and Campbell, 2018; McDonald et al., 2002). Le cœur de la particule virale est inclus dans un complexe ribonucléoprotéique viral appelé complexe de rétrotranscription (RTC). Ce complexe permet la transcription inverse de l'ARN viral simple brin en ADN double brin. Il sera ensuite transporté dans le noyau et intégré dans le génome de la cellule hôte par le complexe de pré-intégration (PIC). Les étapes de transcription inverse et d'intégration ont d'abord été décrites comme distinctes dans le temps et dans l'espace, la transcription inverse s'effectuant uniquement dans le cytoplasme. Récemment, des études ont démontré que ces deux mécanismes peuvent être liés et qu'une transcription inverse complète n'est pas indispensable à l'import nucléaire (Bejarano et al., 2019; Burdick et al., 2013, 2017, 2020). Ainsi, la transcription inverse initiée dans le cytoplasme pourrait dans certains cas se

poursuivre dans le noyau (Dharan et al., 2017; Francis et al., 2020; Rensen et al., 2021).

De nombreuses études se sont penchées sur les mécanismes de la décapsidation. Celle-ci consiste à retirer la capsid du génome viral dans le cytoplasme de la cellule infectée. Plusieurs hypothèses ont été formulées. Certains chercheurs penchent en faveur d'une décapsidation effectuée directement après l'entrée du virus dans la cellule nouvellement infectée (Campbell and Hope, 2015). Tandis que d'autres chercheurs suggèrent que le virus ne perd pas tout de suite ses protéines de capsid. Elles participeraient, au transport du virus vers le noyau, à la transcription inverse et à l'intégration. C'est cette deuxième hypothèse qui est privilégiée puisqu'une étude a démontré que 67% des complexes RTC et PIC contiennent des protéines de capsid (McDonald et al., 2002). Une étude plus récente a démontré la présence de protéines de capsid dans tous les complexes RTC/PIC cytoplasmiques ayant mené à une transcription inverse ce qui suggère un rôle fonctionnel de la capsid (Peng et al., 2014).

La protéine de capsid du VIH-1 participe à de nombreux mécanismes qui permettent une infection par le VIH-1 efficace. Il a été démontré qu'elle participe, au transport de la particule virale dans le cytoplasme de la cellule nouvellement infectée, à l'amarrage des complexes RTC/PIC au niveau de l'enveloppe nucléaire ainsi qu'à l'import nucléaire (pour revue (Novikova et al., 2019)). Plusieurs études ont récemment suggéré que des protéines de capsid intactes et non libres peuvent pénétrer dans le complexe de pores nucléaires (NPC) (Blanco-Rodriguez et al., 2020; Otto, 2021; Selyutina et al., 2020). Les protéines de capsid (CA) interagissent avec les composants du NPC : Nup358 et 153 (Di Nunzio et al., 2012, 2013; Lelek et al., 2015; Matreyek and Engelman, 2013). Un cœur viral composé de capsides sous forme d'hexamère permet la liaison aux protéines cellulaires Nup153 et CPSF6 nécessaires à l'import nucléaire du virus (Buffone et al., 2018; Price et al., 2014). Récemment, il a été démontré que la decapsidation et la formation du PIC pouvaient être nucléaires (Li et al., 2021; Scoca et al., 2020; Zila et al., 2021). La capsid semble donc jouer un rôle conséquent dans de nombreuses étapes de l'infection ne permettant pas uniquement la protection du génome viral. Ainsi, une nouvelle molécule ciblant la capsid virale a été mise au point. Il s'agit du Lenacapavir (Bester et al., 2020) qui inhibe la

decapsidation ainsi que l'interaction des protéines de capsid avec les protéines cellulaires Nup153 et CPSF6 (pour revue (Blanco-Rodriguez and Di Nunzio, 2021; Scoca and Di Nunzio, 2021)).

Pendant que le RTC est transporté par le réseau de microtubules, la transcription inverse du génome viral débute grâce à la transcriptase inverse (RT) virale et grâce à un ARNtLys3 contenu dans la particule virale. La transcription inverse permet de synthétiser un ADN double brin linéaire qui sera intégré dans le génome de la cellule hôte à partir du génome viral ARN. La transcriptase inverse possède deux activités enzymatiques, une activité ADN polymérase ainsi qu'une activité RNase. Cette dernière permet de dégrader l'ARN lorsqu'il fait partie d'un complexe ARN-ADN. Afin de synthétiser l'ADN, la RT a besoin d'une amorce, l'ARNtLys3 contenue dans la PV. Cette amorce est complémentaire à une région située en 5' de l'ARN viral, la région PBS (Primer Binding Region). La synthèse de l'ADN viral induit la formation d'un complexe ADN-ARN qui permet, l'activité RNaseH des RT, la dégradation de l'extrémité 5' de l'ARN viral et la révélation du brin d'ADN (-) nouvellement synthétisé. La transcription inverse se poursuit et donne naissance à un ADN bicaténaire contenant à ses extrémités les régions non codantes LTR ainsi qu'un chevauchement interne d'ADN appelé ADN flap (pour revue (Hu and Hughes, 2012)). La synthèse de l'ADN flap et la fin du transport sont des signaux de decapsidation. Ainsi, le RTC évolue vers le PIC et sera importé vers le noyau (Arhel et al., 2007).

L'étape de transcription inverse étant une étape clé de la réplication du VIH-1, l'enzyme RT a rapidement été la cible des molécules anti-VIH. L'AZT (Azidothymidine), première molécule approuvée dans le traitement de l'infection par le VIH cible cette enzyme.

2.4.3. L'import dans le noyau

Le PIC pénètre dans le nucléoplasme en traversant les complexes des pores nucléaires (NPC) qui forment des canaux stables à travers l'enveloppe nucléaire (Figure 8). Ils maintiennent le trafic de molécules entre le noyau et le cytoplasme et sont composés d'environ 30 protéines différentes appelées nucléoporines (Nup). Le transport du PIC vers le noyau est un mécanisme actif qui fait intervenir des facteurs viraux ainsi que des facteurs cellulaires. Le PIC est composé de l'ADN viral, de

protéines virales (CA, IN, MA, NC, Vpr) et de protéines cellulaires (LEDGF/p75, HMGA1, BAF) (Lusic and Siliciano, 2017).

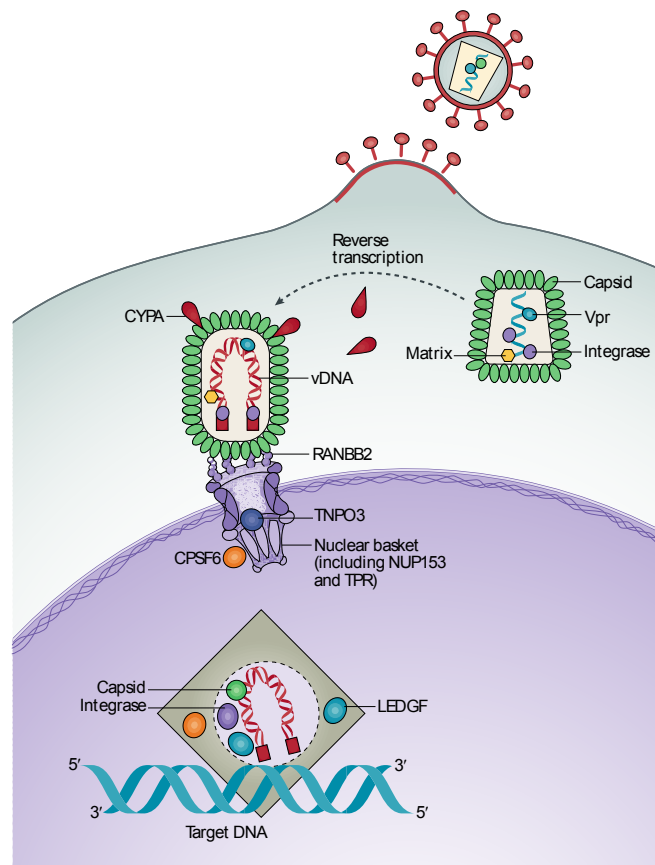


Figure 8 : Mécanisme d'entrée du génome viral dans le noyau puis intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte (Lusic and Siliciano, 2017).

De nombreuses études ont démontré le rôle essentiel de la protéine de capsid dans l'entrée du génome viral dans le noyau de la cellule notamment dans les cellules qui ne sont pas en division. La capsid interagit avec Nup358 (aussi appelée RANBP2) et permet l'amarrage du PIC au niveau du NPC cytoplasmique. De plus, la capsid semble avoir un rôle dans l'import du PIC dans le noyau, du fait de sa présence dans le PIC nucléaire (pour revue (Matreyek and Engelman, 2013)).

La matrice pourrait également jouer un rôle dans l'import nucléaire du PIC car elle possède un signal de localisation nucléaire (NLS). Cependant, son rôle ne semble pas majeur puisqu'une étude a démontré dans les macrophages que lorsqu'elle n'est pas fonctionnelle le cycle viral s'effectue tout de même (Reil et al., 1998). En plus de la protéine de matrice, l'intégrase présente également un NLS et Vpr possède un NLS

non canonique. Ces deux protéines virales ont un rôle dans le transport viral tout comme l'ADN flap décrit dans le paragraphe sur la transcription inverse (pour revue (Matreyek and Engelman, 2013)).

Certains facteurs cellulaires jouent également un rôle dans l'import du génome viral dans le noyau de la cellule hôte : Nup358, Nup153, TNPO3, CPSF6 ainsi que LEDGF/p75. Les nucléoporines Nup358 et Nup153 permettent par exemple le passage via le NPC car elles servent de site d'attachement aux molécules qui transitent. CPSF6 interagit avec la protéine virale de capsid avant l'entrée du génome viral dans le noyau et participe à l'import via Nup358, Nup153 et TNPO3 (Hilditch and Towers, 2014).

2.4.4. L'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte

Une fois dans le noyau, le génome viral va être intégré dans le génome de la cellule cible grâce à l'intégrase présente dans la particule virale (Figure 9). L'intégrase est codée par le gène *pol*. L'intégrase mature est composée de trois domaines structurellement et fonctionnellement distincts : NTD (activité catalytique), CCD (activité catalytique et liaison à l'ADN) et CTD (activité catalytique). L'intégrase procède à deux réactions enzymatiques, le clivage en 3' de l'ADN viral et le transfert de brin. Chaque sous-unité de l'intégrase se lie aux extrémités 3' du LTR et clive deux nucléotides de part et d'autre, ce qui libère des extrémités réactives CAOH-3'-hydroxyles. Les brins complémentaires de l'ADN viral sont ensuite joints aux extrémités 5'-phosphate de l'ADN cellulaire cible. Lors de ce processus, des espaces ou des nucléotides non appariés peuvent apparaître, ces erreurs sont compensées par la machinerie cellulaire de réparation de l'ADN (Engelman and Singh, 2018).

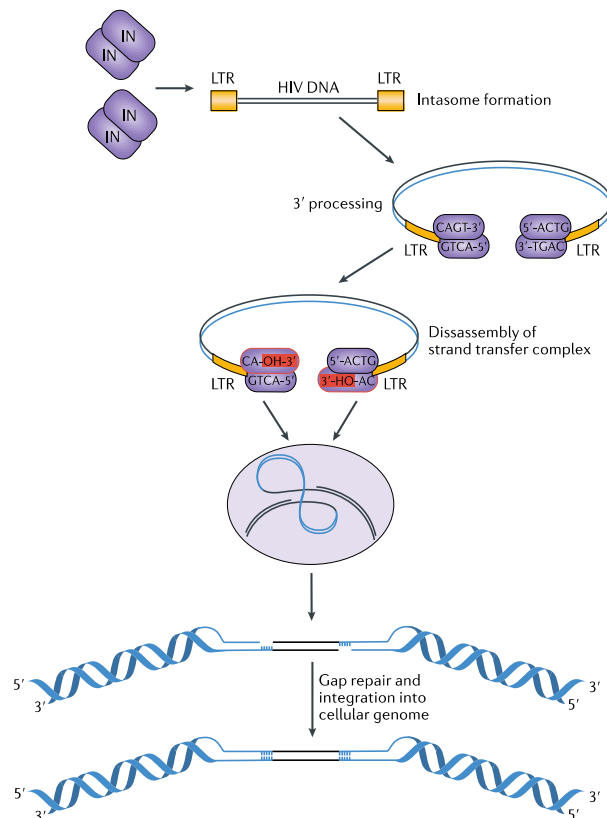


Figure 9 : Mécanisme de l'intégration de l'ADN viral par l'intégrase (Lusic and Siliciano, 2017)

Généralement, c'est la forme d'ADN double brin linéaire (ADN_L) qui est intégrée dans le génome cellulaire. Cependant, des études ont démontré la présence d'autres formes de génome viral. Deux formes circulaires du VIH-1 ont été identifiées, une forme possédant un seul LTR : 1-LTRc et une autre possédant les deux LTR : 2-LTRc. Ces deux formes résultent respectivement de la circularisation de l'ADN_L par le mécanisme de recombinaison homologue (HR) ou par le mécanisme Non-Homologous End-Joining (NHEJ) (Munir et al., 2013). Récemment, une étude a démontré que les formes 2-LTRc pouvaient dans certains rares cas être intégrées au génome cellulaire. Notamment dans des conditions de traitement avec le Raltegravir (inhibiteur d'intégrase) (Thierry et al., 2015), les 2-LTRc peuvent représenter 50% du génome viral par accumulation préalable. La jonction palindromique LTR-LTR peut être clivée et un ADN linéaire viral intégrable est généré (Richetta et al., 2019).

De nombreuses études ont démontré que le VIH s'intègre de façon préférentielle dans les gènes actifs. Schroder, A.R et al ont d'abord démontré que le génome du VIH-1

était principalement intégré dans des régions transcriptionnellement actives dans les lignées de cellules T (Schröder et al., 2002). Ces résultats ont ensuite été confirmés pour de nombreuses autres lignées cellulaires mais aussi pour les cellules T *in vivo* (pour revue (Lusic and Siliciano, 2017)).

Des protéines cellulaires sont aussi impliquées dans le mécanisme d'intégration. La protéine LEDGF participe à la sélection du site d'intégration. Une étude a démontré que l'intégration se faisait préférentiellement dans des régions fortement épissées. LEDGF permet de cibler les unités transcriptionnelles hautement épissées grâce à son interaction directe avec de nombreux facteurs d'épissage (Singh et al., 2015). De plus, des marques épigénétiques identifiées comme favorisant l'expression des gènes (H3K9ac ou H3K36me3) ont fréquemment été retrouvées au niveau des sites d'intégration. LEDGF se lie à la marque H3K36me3 (Marini et al., 2015). LEDGF joue donc un rôle primordial dans le choix du site d'intégration mais aussi dans l'efficacité de cette intégration. D'autres protéines cellulaires sont aussi impliquées dans le mécanisme d'intégration notamment HMGA1, BAF, INI1 ou encore CPSF6 qui permet de cibler le site d'intégration dans de l'euchromatine (Quercioli et al., 2016).

2.4.5. L'expression du génome viral

Une fois le génome du VIH-1 intégré dans le génome de la cellule, le virus va détourner la machinerie de transcription cellulaire afin de permettre l'expression de ses gènes. Jusqu'à présent, les enzymes indispensables au cycle du virus étaient contenues dans la particule virale. Ici, le virus utilise l'ARN polymérase cellulaire II (ARN Pol II) pour transcrire ses gènes. Cette étape se déroule en deux phases, la phase précoce indépendante de la protéine virale Tat et la phase tardive de la transcription où l'activité de Tat est essentielle. Dans certains rares cas, le virus peut également devenir latent. L'étape de transcription est une étape clé de la latence post-intégrative du VIH-1, mécanisme sur lequel nous travaillons au laboratoire. Les mécanismes de la transcription des gènes du VIH-1 seront décrits de façon détaillée dans la partie qui traite de la latence virale afin de faire le lien entre une transcription active et l'état de latence où la transcription est réprimée.

Les cellules possèdent différents mécanismes empêchant l'export du noyau vers le cytoplasme de transcrits incomplètement épissés. Cependant, l'expression du VIH-1

fait intervenir des transcrits uni-épissés, multi-épissés mais aussi non épissés. Ainsi, les ARNm multi-épissés qui codent pour les protéines Tat, Rev et Nef sont exportés de façon classique par les mécanismes de la machinerie cellulaire. En revanche, les transcrits incomplètement épissés sont exportés grâce à la protéine virale Rev. Celle-ci possède un motif NES (Nuclear Export Signal) mais aussi un NLS qui induit son retour dans le noyau. Rev se fixe ensuite sur la région RRE des ARNm viraux ce qui permet l'export des ARNm restant dont ceux qui codent pour les polyprotéines Env, Gag et Gag-Pol (De Breyne and Ohlmann, 2019). La protéine Matrin3, composant de la matrice nucléaire, se lie aux ARN viraux et est requise pour l'exportation nucléaire médiée par Rev des ARN du VIH-1 non épissés (Kula et al., 2011).

2.4.6. L'assemblage, le bourgeonnement et la maturation

Les glycoprotéines qui constituent l'enveloppe virale gp120 et gp41 migrent vers la membrane plasmique dans des vésicules provenant de l'appareil de Golgi. Le précurseur Gag donne naissance aux protéines de structure qui forment la particule virale : MA, CA, NC et le domaine p6. Le précurseur Gag-Pol permet la production des enzymes virales, PR, IN, RT et produit aussi environ 5% des niveaux de Gag. Gag recrute l'ARN génomique viral et rejoint la membrane plasmique. Le virus détourne ensuite le mécanisme cellulaire ESCRT pour finaliser la polymérisation de Gag (débutée lors du trajet dans le cytoplasme) et permettre le bourgeonnement d'une particule virale immature. Pour que le virion devienne infectieux, une étape de maturation est nécessaire pendant laquelle la protéase virale clive les polyprotéines Gag et GagPol. Ceci engendre un réarrangement de la structure de la particule virale et la formation du cœur de la particule grâce à la matrice et la capside situées autour du génome viral ARN (Figure 10) (pour revue (Freed, 2015))

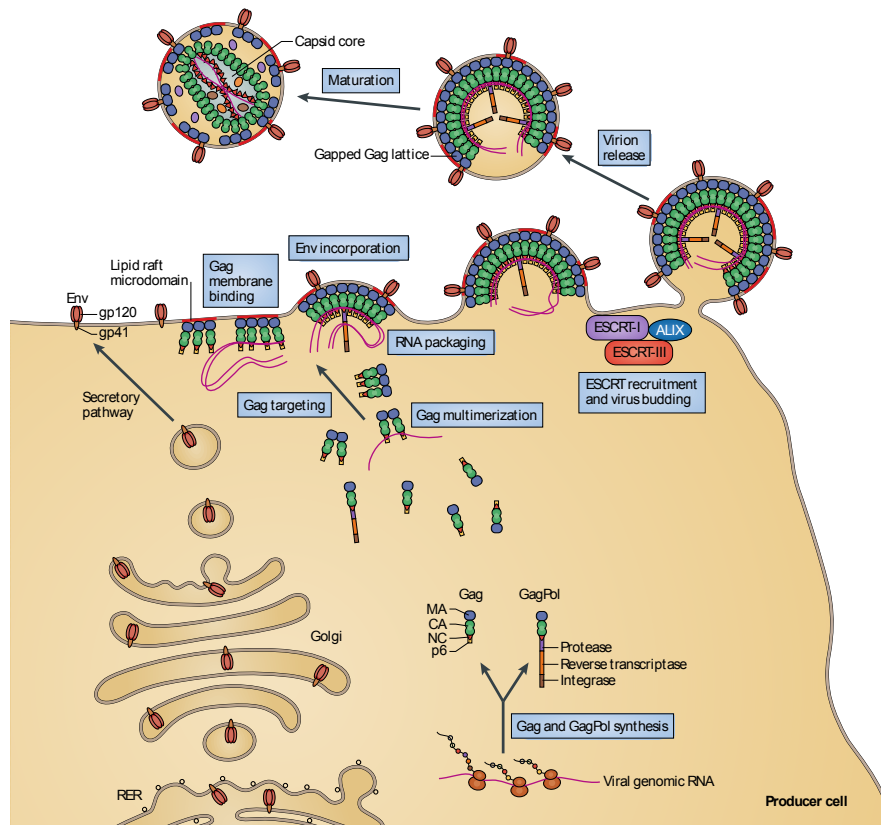


Figure 10 : Mécanismes d'assemblage, de bourgeonnement et de maturation des virions nouvellement synthétisés (Freed, 2015).

2.5. Le traitement du VIH-1

Le traitement du VIH-1 par les antirétroviraux (ARV) a considérablement amélioré la vie des patients infectés. Il existe différentes classes de molécules antivirales qui ciblent certaines étapes du cycle viral (Figure 6) et qui sont utilisées en combinaison de trois molécules. Les buts de la thérapie sont multiples :

- Diminuer la réplication du virus afin que la charge virale diminue sous les niveaux de détection des techniques classiques (50-20 copies d'ARN viral/mL).
- Empêcher la progression de la maladie vers le stade SIDA.
- Diminuer l'activation du SI et l'inflammation induite.
- Empêcher l'apparition de résistance aux ARV.
- Améliorer la qualité de vie des patients.
- Empêcher la transmission du VIH-1 et ainsi diminuer le nombre de personnes séropositives. Une charge virale indétectable permet de diminuer drastiquement

la présence virale dans les sécrétions génitales ce qui rend le risque de transmission quasiment inexistant (Cihlar and Fordyce, 2016; Cohen et al., 2016).

Six classes d'ARV sont disponibles actuellement : les inhibiteurs de CCR5, les inhibiteurs de fusion, les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse, les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse, les inhibiteurs de l'intégrase et enfin les inhibiteurs de la protéase.

Cependant, la multi-thérapie ou cART (combinaison antiretroviral therapy) ne permet pas d'éliminer le VIH-1 de l'organisme et donc de guérir les patients. Afin de contrôler leur virémie, les patients doivent prendre leur traitement en continu pendant toute leur vie. Un arrêt induit une augmentation rapide de la charge virale et une baisse du nombre de LTCD4+ qui affaiblit le système immunitaire (Figure 11) (Davey et al., 1999). De plus, l'arrêt du traitement permet à des virus résistants aux antirétroviraux d'émerger. Il faut ainsi réadapter le traitement et trouver des molécules qui permettent à nouveau de contrôler l'infection. Le rebond de virémie observé à l'arrêt des traitements est principalement dû à la présence de virus latents intégrés dans des cellules appelées réservoirs. Ces réservoirs ne sont pas ciblés par les ARV et sont l'un des blocs majeurs à l'éradication du virus de l'organisme (Deeks et al., 2016).

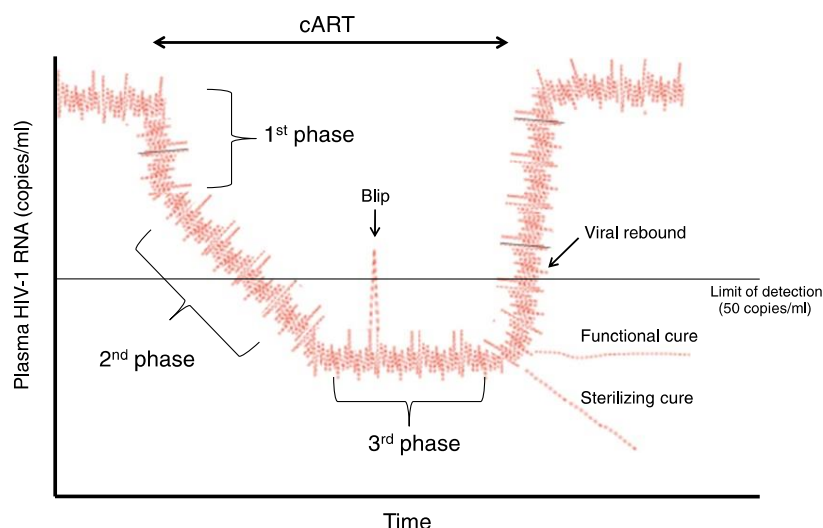


Figure 11 : Évolution de la charge virale au cours du temps et en fonction de l'observance du traitement (Van Lint et al., 2013).

3. Les réservoirs

Les antirétroviraux ont été une avancée majeure dans l'histoire de l'infection par le VIH. En permettant de réduire la charge virale plasmatique sous 50 copies d'ARN du VIH-1/mL (Perelson et al., 1997), cette thérapie a considérablement allongé et amélioré la vie des patients infectés (Mills et al., 2011). Cette suppression de la virémie a donné l'espoir d'éradiquer le virus de l'organisme via cette combinaison de molécules antivirales (Perelson et al., 1997). Mais, des chercheurs ont rapidement démontré la présence de virus latents intégrés dans des LTCD4+ mémoires quiescents qui après activation cellulaire produisaient des virus infectieux (Chun et al., 1995, 1997). Puis, d'autres études ont démontré la présence de ces cellules latentes même sous cART (Chun et al., 1997; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997). Des études se sont aussi penchées sur les autres cellules cibles du VIH-1 qui pourraient participer à la persistance du virus malgré les traitements antiviraux. Ainsi, Honeycutt JB *et al.*, ont démontré l'infection persistante du VIH-1 malgré la prise d'antirétroviraux dans les macrophages tissulaires grâce à un modèle de souris humanisées (Honeycutt et al., 2017). Même si ces événements de latence virale sont rares, plusieurs études ont démontré que le temps nécessaire à l'éradication de ces cellules serait de plus de 60 ans. La cART n'est donc pas suffisante pour les éradiquer (Crooks et al., 2015; Finzi et al., 1999; Siliciano et al., 2003). Pour la grande majorité des personnes vivant avec le VIH, l'interruption de la cART entraîne un rebond rapide de la charge virale. Ce rebond est généralement observé quelques semaines après l'arrêt du traitement et ce, même si le traitement a été initié très rapidement après l'infection et maintenu pendant des années (Colby et al., 2018). Ainsi, la mise en place rapide de la cART permet de limiter la taille des réservoirs, mais pas d'inhiber leur formation. Ces réservoirs latents sont reconnus comme étant le principal frein à l'éradication du VIH-1. Les travaux des années 1990 supposaient que les cellules latentes sont très peu actives. L'émergence des nouvelles technologies a permis de mettre en lumière l'aspect beaucoup plus dynamique et la contribution de multiples facteurs dans la latence virale (Figure 12) (Cohn et al., 2020).

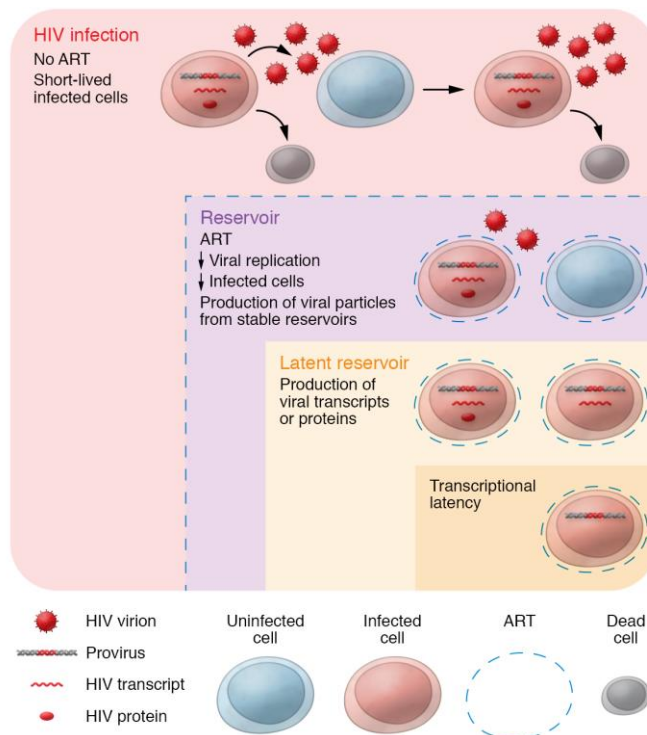


Figure 12 : Persistance du VIH et latence virale (Dufour et al., 2020).

Un réservoir est défini de façon virologique comme un type cellulaire ou un site anatomique associé avec une forme virale compétente du point de vue de la réplication et qui persiste dans l'organisme avec une cinétique plus stable que les virus à réplication active. Une deuxième définition plus pratique existe également. Le réservoir est une population de cellules infectées qui permet la persistance de virus compétents du point de vue de la réplication chez des patients sous cART depuis plusieurs années (Eisele and Siliciano, 2012).

Plusieurs hypothèses sur le maintien des réservoirs ont été proposées. Dans un premier temps, quelques études ont expliqué ce maintien par une réplication virale résiduelle liée notamment à une faible concentration en ARV. Mais cette hypothèse ne fait pas l'unanimité (Kearney et al., 2017). Des études ont démontré une réplication virale à bas bruit chez certains individus (Lorenzo-Redondo et al., 2016) mais qui s'expliquerait plutôt par un traitement moins efficace et un système immunitaire plus affaibli. Aucune preuve solide d'une réplication virale continue chez des personnes recevant des ARV de nouvelle génération n'a été établie (Dinosa et al., 2009; Gandhi et al., 2010b; Hatano et al., 2011; McMahon et al., 2010). La deuxième explication privilégiée du maintien des réservoirs viraux est la présence de cellules infectées

latentes. Celles-ci possèdent des virus intégrés et intacts qui ne produisent pas activement de particules virales infectieuses mais qui peuvent le faire dès lors qu'elles sont stimulées. La latence virale du VIH-1 est depuis longtemps définie par des mécanismes qui répriment la transcription des gènes viraux. Mais de plus en plus d'études démontrent qu'une répression totale de l'expression des gènes est très rare (Hermankova et al., 2003; Yukl et al., 2018). Les nouvelles avancées tendent plutôt vers une inhibition importante et non complète de la transcription, ce qui permettrait tout de même l'expression de petits transcrits viraux dont ceux codant pour Tat (Telwatte et al., 2018; Yukl et al., 2018). En revanche, l'élongation de la transcription qui permet la synthèse de transcrits complets semble, elle, très rare (Lassen et al., 2004), de même que la production de protéines virales (Graf et al., 2013; Pardons et al., 2019) (Figure 12). Pour résumer, il semblerait que l'établissement des réservoirs et de la latence virale soient dus à des mécanismes qui touchent non seulement la transcription des gènes mais également les étapes d'épissage des ARN (Yukl et al., 2018), de l'export des ARN viraux dans le cytoplasme (Lassen et al., 2006) ou encore de la traduction.

Il existe deux types de réservoirs, les réservoirs cellulaires et les réservoirs anatomiques (pour revue (Eisele and Siliciano, 2012)). Dans certains cas, ces derniers peuvent également être définis comme des sanctuaires, notamment en raison de la faible pénétration des molécules antirétrovirales.

3.1. Les réservoirs cellulaires

Trois critères sont déterminants pour qu'un type cellulaire soit défini comme un réservoir cellulaire :

- 1) La présence d'ADN du VIH-1 intégré dans le génome hôte de cellules à longue durée de vie.
- 2) L'existence de mécanismes permettant aux virus de persister pendant une longue période dans des cellules latentes.
- 3) La formation de particules virales compétentes pour une réplication suite à l'activation des réservoirs viraux.

Les lymphocytes T CD4⁺ mémoires sont le principal réservoir cellulaire du VIH-1. Cependant, d'autres types cellulaires dérivés de la lignée myéloïde semblent également avoir un rôle pertinent en tant que réservoirs du VIH (pour revue (García et al., 2018))

3.1.1. Les lymphocytes T CD4 + mémoires

Les LTDC4⁺ sont les principales cellules infectées par le VIH-1 et elles sont également le principal réservoir de cellules latentes lorsqu'elles sont dans l'état de cellules mémoires. Deux types de LTCD4⁺ sont principalement décrits comme réservoirs du VIH-1, les Tfh et les Th17 (García et al., 2018). Les Tfh sont des lymphocytes principalement retrouvés dans les ganglions lymphatiques au niveau des zones folliculaires particulièrement protégées des lymphocytes T cytotoxiques. On parle alors de sanctuaire (Banga et al., 2016; Fukazawa et al., 2015; Miles and Connick, 2016). Les Th17 principalement retrouvés dans les tissus gastro-intestinaux sont également une cible privilégiée du VIH-1.

Lorsqu'on regarde le phénotype des cellules mémoires, les principales cellules T réservoirs du VIH-1 sont les sous types T_{CM} (central memory), T_{TM} (transitional memory) et T_{EM} (effector memory) (Figure 13). Des études ont démontré la présence d'ADN viral dans ces sous-types contrairement aux T_N (naïfs) et aux T_{TD} (T terminal differentiated). Plus récemment, un nouveau sous-type a été reconnu comme possible réservoir du VIH-1, les T_{SCM} (stem cell memory cells). Ces cellules contiennent de l'ADN VIH et persistent des années. Ce dernier sous-type est certainement le réservoir viral le plus stable sous cART (Buzon et al., 2014; Chomont et al., 2009; Jaafoura et al., 2014).

La latence dans ces cellules est établie lors de la formation des cellules T mémoires. Le VIH-1 infecte des lymphocytes T CD4⁺ en train d'évoluer vers l'état de mémoire. Le virus persiste ainsi dans ces cellules qui ont une longue durée de vie (pour revue (Siliciano and Greene, 2011)). Une étude a mis en évidence une infection de cellules T mémoires sans activation préalable (Swiggard et al., 2005). Cependant, ce mécanisme semble être très rare. La voie principale de formation des réservoirs est celle mentionnée en premier, du fait notamment de la répression par des facteurs de

restriction comme SAMHD1 des étapes de transcription inverse et d'intégration du génome viral dans ces cellules mémoires (Baldauf et al., 2012; Descours et al., 2012; Pan et al., 2013).

Récemment, une étude (Sannier et al., 2021) s'est penchée sur la diversité des réservoirs viraux. Pour ce faire, ils ont conçu une méthode d'analyse combinée, permettant l'étude unicellulaire approfondie des réservoirs viraux en termes de transcription, traduction, phénotype cellulaire et intégrité du provirus. Cette analyse a ainsi permis de révéler que les provirus réactivés par les LRAs sont génétiquement défectueux. Les LRAs induisent efficacement la transcription dans tous les sous-ensembles de cellules mémoires mais l'induction de la traduction est retrouvée principalement dans les cellules mémoires effectrices (T_{EM}), plutôt que dans les cellules mémoires à longue durée de vie (Figure 13).

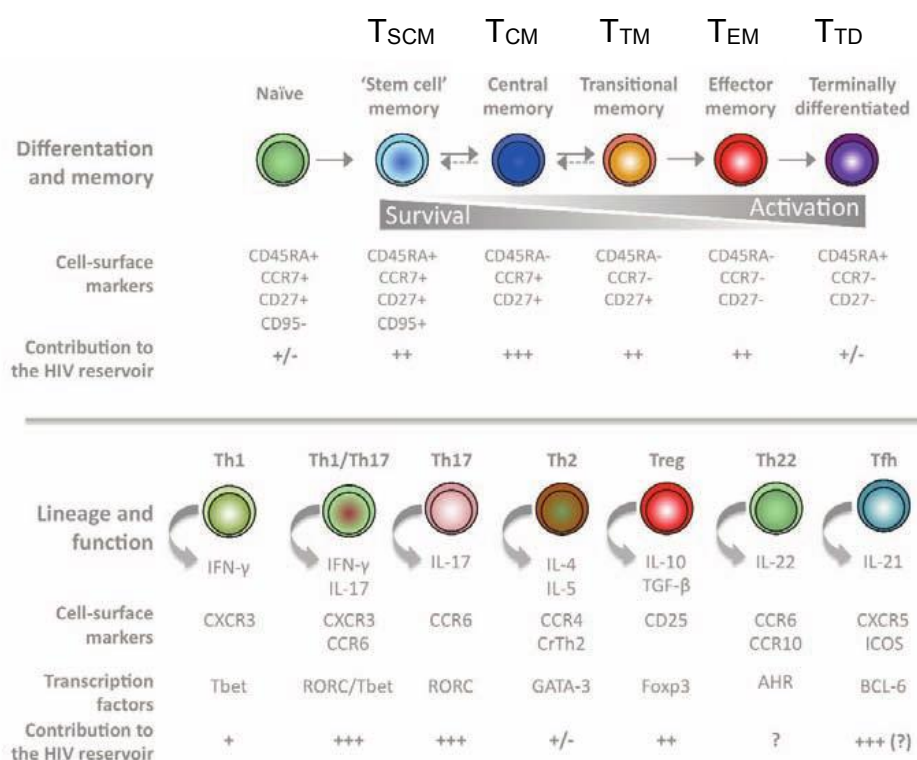


Figure 13 : Contribution des sous-types de cellules T CD4+ au réservoir du VIH sous cART selon leur état de mémoire (en haut) ou selon leurs fonctions effectrices (en bas) (Kulpa and Chomont).

3.1.2. Les monocytes et les macrophages

Les monocytes et macrophages sont des cellules de la lignée myéloïde. Les monocytes qui circulent dans le sang, proviennent d'un précurseur myéloïde dans la moelle osseuse. Une fois dans les tissus, ils peuvent se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques (Le Douce et al., 2010). Ces cellules sont également des cibles du VIH-1 qui s'y réplique et produit de nouveaux virions (Gartner et al., 1986; Igarashi et al., 2001), notamment grâce au récepteur CD4 et aux corécepteurs présents sur ces cellules (Lee et al., 1999). Les macrophages résistent mieux aux effets cytopathiques du VIH-1 que les LTCD4⁺ (Koenig et al., 1986). Dans un second temps, ces cellules sont une importante source de virus, lorsque la plupart des LTCD4⁺ auront été éliminés par le VIH-1 (Igarashi et al., 2001). En plus des LTCD4⁺ mémoires, il a été démontré que les macrophages contribuent au rebond de virémie observé à l'arrêt des ARV (Araínga et al., 2017; Kumar et al., 2014; Veenhuis et al., 2021). En revanche de nombreuses études se sont penchées sur le cas des monocytes. Peu ont réussi à démontrer qu'ils pouvaient être considérés comme un réservoir viral notamment en raison du fait qu'ils se différencient rapidement (Siliciano and Greene, 2011). Les monocytes dit «classiques» (CD14⁺ CD16⁻) qui représentent 85% des monocytes chez les personnes non infectées sont peu permissifs à l'infection par le VIH-1 (Ellery et al., 2007; Passlick et al., 1989). Des études ont démontré chez le sous-type CD14⁺ CD16⁺, la présence d'ADN viral en très faible quantité (Ellery et al., 2007).

Cependant, les monocytes étant des cellules circulantes, elles jouent un rôle dans la diffusion du virus dans l'organisme (Figure 14). Des monocytes infectés par le VIH-1 peuvent traverser la barrière hématoencéphalique et infecter les macrophages ou les cellules microgliales du système nerveux central (SNC) (Gras and Kaul, 2010). Ces macrophages et cellules microgliales infectées participent activement à la persistance du VIH-1 dans le SNC (Schnell et al., 2009). Plusieurs études ont démontré que ces cellules sont des réservoirs du VIH-1 (Clements et al., 2002; Koenig et al., 1986).

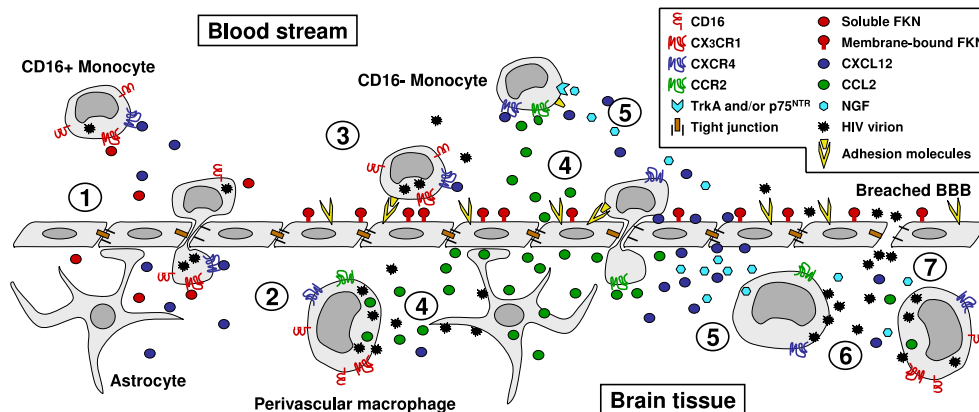


Figure 14 : Mécanisme d'entrée du VIH-1 dans le SNC (pour revue (Gras and Kaul, 2010))

3.1.3. Les cellules microgliales

Les cellules microgliales sont les cellules du système immunitaire inné qui résident dans le cerveau (Bilimoria and Stevens, 2015). Elles apparaissent très tôt au cours de l'embryogenèse et dérivent de précurseurs myéloïdes précoces. Elles colonisent ensuite tout le parenchyme cérébral avant que la barrière hémato-encéphalique (BHE) ne se forme. Elles persistent dans le SNC du fait de leur division cellulaire très lente. Une étude récente a estimé que les cellules microgliales ont en moyenne 4,2 ans et que certaines cellules peuvent atteindre 20 ans (Réu et al., 2017). Elles sont permissives au VIH-1 et semblent être infectées par les monocytes CD14+ CD16+ comme décrit précédemment. Plusieurs études sur des modèles cellulaires, animaux ainsi que sur des échantillons issus d'autopsies de patients séropositifs au VIH-1 ont permis de démontrer que les cellules microgliales sont infectées par le VIH-1 et qu'elles constituent des réservoirs viraux (pour revue (Wallet et al., 2019)). Deux études ont clairement établi l'infection par le VIH-1 de ces cellules en démontrant la présence d'ADN, d'ARN et de protéines virales du VIH-1 dans les cellules microgliales (Churchill et al., 2006; Cosenza et al., 2002). L'infection du SNC par le VIH-1 et sa persistance sous forme latente dans ce compartiment a été démontrée dans différentes études qui se basaient sur des modèles animaux comme les macaques et les souris humanisées (Avalos et al., 2017; Gama et al., 2017; Whitney et al., 2014). Récemment, une étude réalisée par Ko *et al*, a permis de démontrer la présence de cellules microgliales infectées chez les patients sous cART avec une charge virale indétectable. La cohorte National Neuro AIDS Tissue Consortium a été utilisée pour

cette étude qui a permis de mettre en lumière la présence d'ADN du VIH-1 dans tous les échantillons et notamment dans les cellules microgliales. Ils ont également trouvé chez certains patients de l'ARN viral. Ces résultats permettent d'affirmer que les cellules microgliales peuvent être considérées comme un réservoir viral. Cette étude a été primordiale pour prouver que le génome viral persiste dans les macrophages et les cellules microgliales du cerveau sous thérapie antirétrovirale suppressive (Ko et al., 2019).

3.2. Les réservoirs anatomiques

Les réservoirs anatomiques du VIH-1 sont également pour la plupart des sanctuaires viraux, définis par de faibles concentrations en molécules antirétrovirales en raison de la présence de barrières physiques et grâce à un environnement immunologique privilégié. Ces deux caractéristiques des sanctuaires permettent au virus de se répliquer facilement sans rencontrer de réel frein (système immunitaire). Le SNC est préservé par la barrière hématoencéphalique et le tractus génital par la barrière hémato-testiculaire. Comme réservoir anatomique, on retrouve également les organes lymphoïdes avec le tissu lymphoïde associé au tube digestif ou encore les ganglions lymphatiques où sont principalement localisés les lymphocytes T mémoires (pour revue (Svicher et al., 2014)).

3.2.1. Le système nerveux central

Comme décrit précédemment, l'infection de certaines cellules du SNC par le VIH-1 a clairement été établie. Les cellules microgliales et les macrophages périvasculaires font partie de ces cellules infectées dans le SNC par des monocytes ou des LTCD4+ qui entrent dans le cerveau. Ils constituent les réservoirs du VIH-1 dans cet organe (Ko et al., 2019). En revanche, les astrocytes sont une cible importante du VIH-1 dans le SNC avec 10 à 20% de cellules infectées (Churchill et al., 2009) mais ils ne semblent pas former un réservoir (Gorry et al., 2003; Ko et al., 2019). L'infection du SNC par le VIH-1 a d'importantes conséquences physiopathologiques. Ainsi, avant la mise en place de la cART, la présence du VIH-1 dans cet organe était associée au développement de démences (González-Scarano and Martín-García, 2005; McArthur et al., 2010). Sa mise en œuvre, a permis une importante réduction des formes sévères

de HAND (HIV-1-associated neurocognitive diseases). En revanche, les formes plus légères restent stables (Eggers et al., 2017). Le système nerveux central est connu pour être un sanctuaire du VIH-1 en raison de la barrière hémato-encéphalique qui affecte la réponse immunitaire et réduit la pénétration de la cART (Letendre et al., 2008).

3.2.2. Les tissus lymphoïdes associés aux intestins

Une importante partie des lymphocytes totaux dans le corps se trouve dans des sites spécialisés le long du tractus gastro-intestinal. Or, les LTCD4⁺ sont les principales cibles du VIH-1 et constituent aussi le plus important réservoir de cellules infectées latentes. Lors de l'infection, le nombre de lymphocytes T mononucléaires CCR5⁺ CD4⁺ des muqueuses du tractus gastro-intestinal infectés est fortement réduit (jusqu'à 60 %). Les LTCD4⁺ infectés restants, reviennent à un état quiescent et persistent malgré une cART suppressive. Le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) comprend les plaques de Peyer et des structures lymphoïdes organisées dans l'intestin grêle (pour revue (Eisele and Siliciano, 2012)).

3.3. Les conséquences de l'infection du SNC

Il est désormais clairement établi que des cellules du SNC sont infectées par le VIH-1 lors de l'infection active. Mais dans certains cas, le virus est également présent dans ces cellules sous sa forme latente. La présence du VIH-1 dans le SNC a un effet sur son fonctionnement puisqu'on retrouve des troubles neurocognitifs associés au VIH-1 (HAND) (Lamers et al., 2010; Salemi et al., 2005; Sutherland and Brew, 2018). Dans les premiers stades, les patients atteints de HAND ont des difficultés de concentration, de mémoire et peuvent avoir des fonctions exécutives altérées. Lorsque la maladie progresse, des signes de ralentissement psychomoteur (dépression, irritabilité) ainsi que des signes moteurs légers apparaissent (Eggers et al., 2017). Les HAND peuvent être classés selon les critères Frascati en 3 groupes (Figure 15) :

- Les démences associées au VIH (HAD) qui sont les formes les plus sévères.
 - Les troubles neurocognitifs légers (MND).
 - Les troubles neurocognitifs asymptomatiques (ANI)
- (Antinori et al., 2007; Gandhi et al., 2010a).

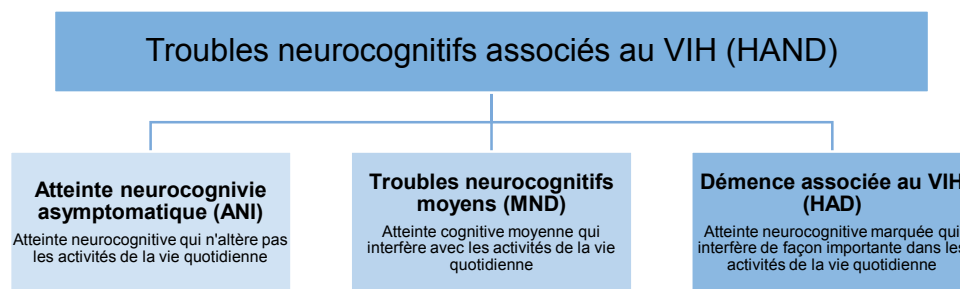


Figure 15 : Classification des HAND selon les critères de Frascati (d'après (Sutherland and Brew, 2018))

Avant la mise sur le marché des antirétroviraux, environ 10 à 20% des personnes vivant avec le VIH étaient atteintes de HAD. Avec l'arrivée de la cART fin des années 1990, le taux de HAD a chuté entre 2 et 3%. La cART a permis de réduire considérablement les atteintes neurologiques sévères (Dore et al., 1999; Heaton et al., 2010; Sacktor et al., 2016). La réduction est moindre pour les formes légères de HAND, environ 20 à 50% des personnes vivants avec le VIH-1 sont atteintes de ces formes de HAND. Même lorsque le virus est indétectable dans le plasma, il y a un risque de progression de l'atteinte neurocognitive (Antinori et al., 2007; Brew, 2004; Venkataramana et al., 2006). Cependant, lorsque le diagnostic et le traitement sont effectués rapidement, la prévalence des HAND est faible (Crum-Cianflone et al., 2013). Le risque d'une atteinte neurocognitive pourrait être lié au taux de LTCD4+ persistants. Si le nombre de LTCD4+ est faible en raison d'un traitement trop tardif, le risque de développer une atteinte neurologique semble plus important (McCutchan et al., 2007).

Les causes des atteintes neurocognitives liées à l'infection par le VIH-1 semblent multiples (Figure 16) : la neuro-toxicité de certains ARV ; la réplication virale dans le SNC ; l'inflammation persistante dans le SNC (pour revue (Sutherland and Brew, 2018)). Les réservoirs viraux présents dans le SNC sont une cause de ces atteintes notamment par la présence de protéines virales telles que Tat ou gp120 qui impactent l'intégrité neuronale via leur interaction avec le récepteur NMDAR (N-methyl-D-Aspartate receptors) (pour revue (Rao et al., 2014)).

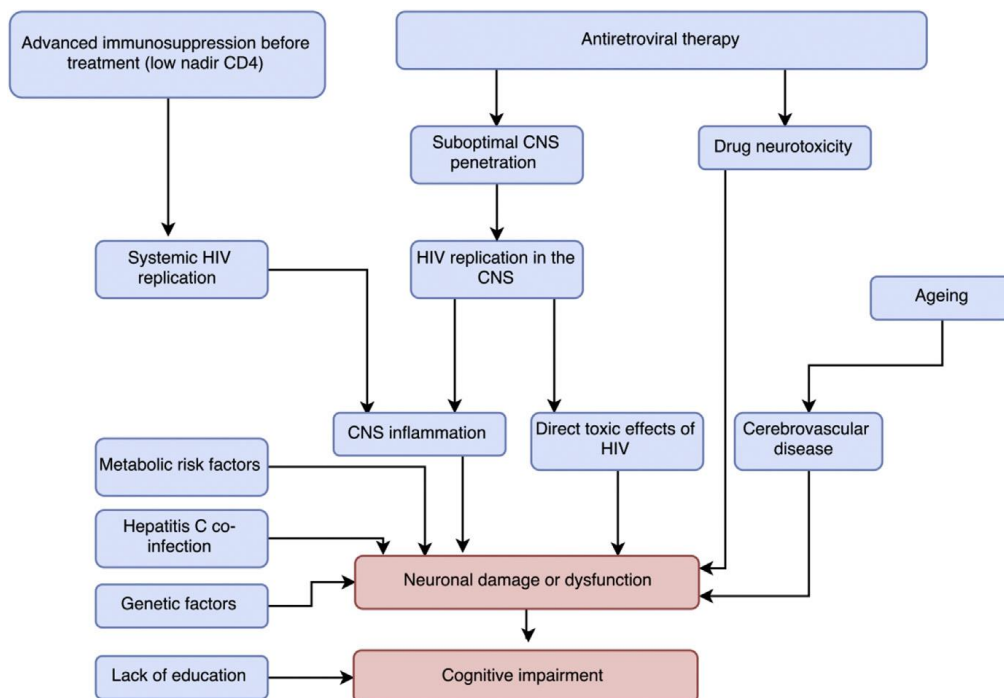


Figure 16 : Facteurs pouvant induire les atteintes neurocognitives retrouvées chez les personnes vivant avec le VIH (Sutherland and Brew, 2018).

Les cellules microgliales sont en contact permanent avec les autres cellules du SNC dont les neurones, les astrocytes ou encore les vaisseaux sanguins. Elles ont comme rôle l'élimination, des pathogènes, des cellules mortes, des synapses redondantes, des agrégats de protéines et d'autres antigènes qui peuvent mettre en danger le SNC (Colonna and Butovsky, 2017). Lorsqu'elles sont activées, elles produisent des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des chimiokines qui peuvent contribuer à la neuroinflammation et donc à l'atteinte cognitive (Hong and Banks, 2015). Ainsi, la neuroinflammation qui conduit à des maladies neurodégénératives telles que les HAND, est associée à une atteinte des cellules microgliales (Ginsberg et al., 2018). De plus, de récentes études ont démontré qu'une neuroinflammation ainsi qu'une activation des cellules microgliales étaient visibles chez les patients infectés par le VIH-1 même s'ils avaient une cART efficace (Tavazzi et al., 2014; Vera et al., 2016). Les études menées sur les cellules microgliales et les HAND ont permis de conclure que tout mécanisme qui impacte ces cellules expliquerait en partie les troubles neurocognitifs associés au VIH-1.

4. La latence post-intégrative du VIH-1

Deux formes de latence virale ont été décrites, la latence pré-intégrative et la latence post-intégrative. La première résulte d'un blocage d'une des étapes qui précèdent l'intégration du génome du VIH-1 dans le génome cellulaire. Cette latence n'est pas définitive puisqu'il est possible que le génome viral soit intégré si les mécanismes qui inhibent le cycle viral sont levés. Plusieurs causes permettent d'expliquer la latence pré-intégrative : une transcription inverse incomplète, un PIC déficient ou encore la présence de facteurs de restriction comme APOBEC3G. Cette forme de latence est fréquemment observée dans les lymphocytes T CD4⁺ et les monocytes/macrophages (pour revue (Bouchat and Lint, 2019)). Plusieurs formes non intégrées de génome viral peuvent être retrouvées, une forme linéaire mais aussi deux formes circulaires présentant 1 ou 2 LTR comme décrit précédemment (Munir et al., 2013; Richetta et al., 2019). Ces formes de génome viral non intégrés peuvent persister plus ou moins longtemps selon le type cellulaire. Une cellule qui se divise lentement comme les monocytes/macrophages peut conserver ces formes spécifiques jusqu'à deux mois (pour revue (Bouchat and Lint, 2019)). Cependant, même si ces formes non intégrées peuvent s'intégrer dans un second temps dans le génome des cellules infectées, il semblerait que ce soit principalement la latence post-intégrative qui participe à la persistance du virus à long terme.

La latence post-intégrative est responsable de la persistance des réservoirs. Elle est due à une multitude de mécanismes qui empêchent l'expression des gènes du VIH-1 suite à l'intégration du génome viral. Les cellules infectées de manière latente sont maintenues dans cet état par des mécanismes opérant à différents niveaux. Ainsi l'inhibition, de la transcription, de l'export des ARN viraux dans le cytoplasme ou encore de la traduction par les microARN peuvent interférer avec l'expression efficace du génome viral. Cependant, pour la majorité des cellules latentes le bloc se situe au niveau transcriptionnel (pour revue (Van Lint et al., 2013)).

4.1. La transcription du VIH-1 et Tat

4.1.1. La transcription des gènes du VIH-1

La transcription du VIH-1 dépend du recrutement de la machinerie de transcription cellulaire. Cependant, elle est également fortement renforcée par l'activité de la protéine virale Tat.

La transcription se divise en deux phases, une première phase indépendante de Tat dirigée par différents facteurs de transcription cellulaires. Elle permet principalement l'initiation de la transcription et la synthèse des transcrits codant notamment pour la protéine virale Tat (Figure 17). Le promoteur du VIH-1 présente plusieurs sites de liaison à des facteurs de transcription ce qui permet l'expression du génome du VIH-1. Puis la deuxième phase dépendante de Tat permet l'élongation des transcrits initiés lors de la première phase.

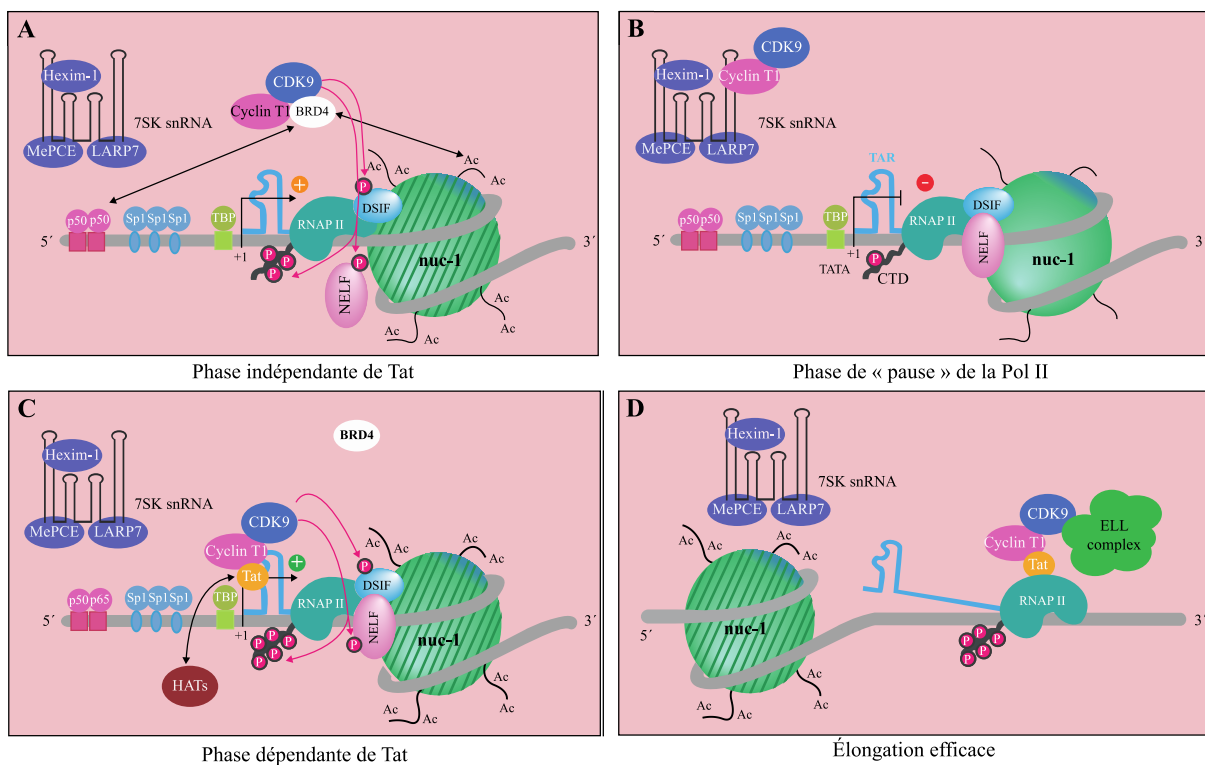


Figure 17 : Mécanismes de la transcription du VIH-1 (d'après (Bouchat and Lint, 2019)).

4.1.1.1. Initiation de la transcription ou phase précoce en absence de Tat

L'initiation de la transcription est un processus multifactoriel complexe. Ainsi l'ouverture de la chromatine, l'assemblage du complexe de préinitiation, le recrutement et enfin la maturation de l'ARN Pol II peuvent moduler cette étape (Schier and Taatjes, 2020). Le promoteur du VIH-1 possède de nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription cellulaires. Plus de 40 facteurs cellulaires se lient au promoteur viral. Ces facteurs sont activés et se lient au promoteur sous l'action de stimuli. Ainsi, la transcription des gènes du VIH-1 débute par le recrutement des facteurs cellulaires Sp1, NF- κ B et NFAT (pour les lymphocytes T). Ils induisent à leur tour le recrutement de facteurs modifiant la chromatine afin que l'environnement chromatinien du promoteur permette l'initiation de la transcription (Karn, 2011). Puis la TATA-binding protéine (TBP) contenue dans TFIID est recrutée sur la TATA box du promoteur. Ceci induit la formation du complexe de préinitiation contenant l'ARN polymérase II et le facteur TFIIH. Les autres facteurs généraux de la transcription sont ensuite recrutés (TFIIA, B, E, F). Dans le complexe de préinitiation, l'ARN Pol II est sous une forme hypophosphorylée. La phosphorylation de la sérine 5 du domaine CTD (C-Terminal Domain) de l'ARN Pol II par l'activité kinase du facteur TFIIH permet de poursuivre la transcription. Des transcrits courts de moins de 100 nucléotides qui correspondent principalement à l'élément TAR sont alors synthétisés. Une fois les premiers cent nucléotides transcrits, l'ARN Pol II se met en pause. Deux facteurs négatifs d'élongation interviennent dans ce mécanisme. NELF (negative elongation factor) et DSIF (DRB-sensitivity inducing factor) bloquent la progression de l'ARN Pol II (Conaway et al., 2000). De ce fait, un grand nombre de ces enzymes est accumulé au niveau du promoteur viral. Une conformation spécifique entre l'ADN matrice et l'ARN néosynthétisé dans la polymérase empêche également l'addition de nucléotides supplémentaires (Vos et al., 2018a). Cette structure particulière est stabilisée par le facteur NELF. De plus, le facteur DSIF empêche la liaison du facteur TFIIIS qui permet le clivage des ARN pour que les polymérases puissent redémarrer (Cheung and Cramer, 2011). Mais la présence de certains facteurs de transcription comme NF- κ B dans le noyau permet la synthèse à bas bruit de transcrits viraux qui codent pour la protéine virale Tat.

Récemment, une étude s'est penchée sur ce mécanisme de pause et sur la manière dont affecte la transcription virale (Tantale et al., 2021). Ils ont constaté que les ARN Pol II entrent dans une pause de longue durée au niveau des promoteurs latents du VIH-1 limitant ainsi efficacement la transcription virale. Mais dans certains cas, il a été observé dans les cellules latentes une levée de la pause et donc une synthèse d'ARN viral. Ceci peut ainsi permettre la sortie de la latence et fournir une explication aux rebonds viraux ou blips observés chez certains patients.

4.1.1.2. Élongation de la transcription ou phase tardive en présence de Tat

La protéine virale Tat permet de lever la pause des ARN Pol II en se liant à la structure TAR des ARN précédemment initiés. Ceci permet le recrutement du complexe PTEF-b (positive transcription elongation factor b) composé de la cycline T1 et de la kinase Cdk9 (cyclin-dependent kinase 9). La kinase du complexe PTEF-b, phosphoryle certains composants du complexe de pause de l'ARN Pol II, dont les facteurs négatifs NELF et DSIF. La phosphorylation du facteur NELF permet sa dissociation de la polymérase et libère un site de fixation du facteur PAF. Ce facteur d'élongation est nécessaire à la poursuite de la transcription. DSIF lui aussi phosphorylé, adopte une conformation différente en fonction du complexe (pause ou élongation) dans lequel il se trouve. Lorsqu'il est phosphorylé, il se détache des ARN synthétisés afin de permettre l'élongation. De plus, PTEF-b permet la phosphorylation de la sérine 2 du CTD de l'ARN polymérase II permettant également la levée de la pause par libération du site de fixation du facteur d'élongation SPT6 (Vos et al., 2018b).

La fixation de Tat sur la TAR et le recrutement de PTEF-b permettent d'établir une boucle de rétroaction positive dans laquelle Tat est surexprimé et stimule de façon importante la transcription du VIH-1. Tat peut former deux complexes distincts et stables nommés Tatcom1 et Tatcom2. Tat permet l'assemblage d'un complexe multifonctionnel d'élongation de la transcription, Tatcom1. Il contient des facteurs d'élongation dont P-TEFb, ELL, ENL, PAF1 et active de façon optimale le promoteur du VIH-1. Le recrutement de ces facteurs dans le complexe Tat/P-TEFb permet une activité CTD-kinase accrue. Cependant, Tat peut aussi former un complexe stable avec 7SK snRNP sans HEXIM1 et SART3, appelé Tatcom2. Ce complexe stable peut aider à maintenir l'équilibre de P-TEFb (Sobhian et al., 2010).

Deux études sur PTEF-b ont conduit à l'identification d'un complexe multiprotéique beaucoup plus conséquent contenant PTEF-b, des facteurs d'élongation cellulaires et des coactivateurs appelé super elongation complex (SEC). Ce complexe participe activement à la levée de la pause et permet aussi le remplacement des complexes Tat/P-TEFb/ARN Pol II non efficaces (pour revue (Bouchat and Lint, 2019; Ne et al., 2018)). Tat est également capable de moduler l'activité de Cdk9 pour qu'elle phosphoryle les sérines 5 du CTD normalement cible de Cdk7 (cyclin-dependent kinase 7) de TFIIH. Cela augmente encore l'activité d'élongation de l'ARN Pol II. Enfin, Tat peut recruter des histones acétyltransférases (HATs) pour moduler la structure de la chromatine et ainsi participer à la levée de l'initiation de la transcription du point de vue épigénétique (pour revue (Bouchat and Lint, 2019)). En conclusion, le recrutement de PTEF-b par Tat induit différentes phosphorylations qui perturbent le complexe de pause de l'ARN Pol II et induit aussi la formation d'un complexe d'élongation actif qui comprend l'ARN Pol II, DSIF, SPT6 et PAF (Tantale et al., 2021).

4.1.2. La protéine virale Tat

4.1.2.1. La structure de Tat

La protéine virale Tat (transactivator of transcription) est une protéine nucléaire de petite taille, environ 15 kDa. Tat comporte généralement 101 acides aminés (aa) et deux exons. Le premier exon code les acides aminés 1 à 72 et le second code pour les acides aminés 73 à 101. La forme principale de Tat comprend 101 acides aminés, les formes de Tat plus petites sont dues à des changements dans le deuxième exon par la présence d'un codon d'arrêt. Une protéine Tat tronquée à son extrémité C-terminale et codée uniquement par le premier exon peut être générée lorsque des ARN viraux non épissés sont exportés vers le cytoplasme par la protéine virale Rev. Mais la forme Tat 72aa est suffisante pour l'élongation de la transcription (Hetzer et al., 2005). Une fois la transcription de l'ARNm de Tat terminée, les transcrits subissent un double épissage, ce qui entraîne l'élimination de la région non codante entre les deux exons codants.

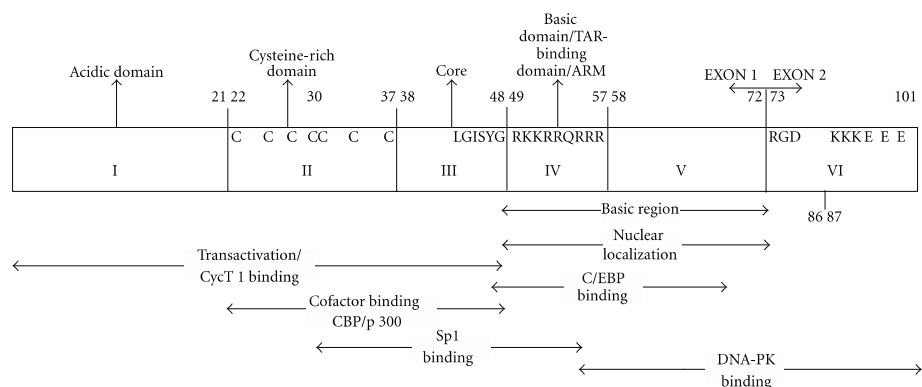


Figure 18 : Représentation de Tat et des 6 domaines qui le composent (Li et al., 2012a)

Tat peut être divisé en 6 domaines (Figure 18) (pour revue (Li et al., 2012a)) :

- Le premier se situe en N-terminal et est appelé domaine acide du fait de sa composition avec de nombreux aa acides. Il contient les aa de la position 1 à 21, il est riche en proline et contient aussi un aa tryptophane conservé. Cette région peut former une hélice alpha.
- Le second domaine situé entre les aa 21 et 37 est appelé domaine riche en cystéine. Il possède 7 cystéines dont 4 participent à la formation de ponts disulfures. Ces cystéines sont primordiales puisqu'un changement de celles-ci impacte la fonction de Tat (Kalantari et al., 2008).
- Le troisième domaine situé entre les aa 38 et 48 possède une séquence centrale hydrophobe entre les aa 43 et 48.

Ces trois premiers domaines forment la région minimale nécessaire à l'activité de transactivation de Tat. CTIP2, un facteur de transcription cellulaire essentiel à la latence virale, lie la région de Tat 1-48 aa (Rohr et al., 2003). Il a été démontré qu'un changement dans la deuxième partie de cette région (22-40aa) peut fortement impacter l'activité concernée de Tat.

- Le quatrième domaine de la protéine virale Tat appelé domaine basique a un rôle très important dans les fonctions de Tat. Ce domaine situé entre les aa 49 et 57 possède un motif fortement conservé $_{49}\text{RKKRRQRRR}_{57}$. Ce motif riche en arginine, permet la liaison à la TAR des ARN viraux initiés et permet également la localisation nucléaire de Tat (Dingwall et al., 1989; Roy et al., 1990; Weeks and Crothers, 1991).

- Le cinquième domaine de Tat situé entre les aa 58 et 72 est un domaine riche en arginine et il possède une forte variation au niveau de sa séquence.

Les domaines 4 et 5 de Tat composent sa région basique.

- Le domaine 6 est codé par l'exon 2 de la protéine Tat et est composé des aa 73 à 101. Dans ce domaine, deux motifs ont été identifiés. Le domaine RGD permet la liaison aux intégrines et le motif fortement conservé ESKKKVE pourrait participer à une réplication virale effective. Le domaine de transactivation de Tat est principalement porté par l'exon 1 de la protéine. Cependant des études ont démontré que l'exon 2 joue également un rôle. Certains résidus acide glutamique et lysine de l'exon 2 sont essentiels notamment dans l'activation du facteur de transcription NF-kB (Barillari et al., 1999; Fiorelli et al., 1999; Neuveut et al., 2003; Smith et al., 2003). De plus, une étude a démontré que les virus à tropisme macrophage qui expriment la forme complète de Tat se répliquent mieux dans les macrophages dérivés de monocytes (MDM) qu'un virus qui exprime uniquement la forme de Tat à un exon (Neuveut et al., 2003).

4.1.2.2. Les fonctions de Tat

La principale fonction de Tat reste la transactivation du promoteur viral par ses domaines riches en proline, cystéine et son domaine central décrit dans la partie précédente. Cependant, ses effets sur les cellules infectées et non infectées sont multiples. Un important effet de Tat est l'induction de l'apoptose dans de nombreuses cellules notamment les lymphocytes T et les neurones (Aksenov et al., 2009; Kruman et al., 1998; McCloskey et al., 1997; Purvis et al., 1995). De plus, Tat peut se lier à un certain nombre de facteurs de transcription impliqués dans l'expression du VIH-1. Ainsi, Tat peut interagir avec Sp1, ce qui augmente l'expression des gènes du VIH. Il peut aussi interagir avec TFIIH, ce qui augmente la phosphorylation de l'ARN Pol II. Il a également été démontré que Tat peut interagir avec différentes HATs afin de modifier l'environnement hétérochromatinien et d'augmenter l'expression du génome viral (pour revue (Bouchat and Lint, 2019)). Plusieurs études ont démontré l'impact de Tat sur le SNC. Tat peut être neurotoxique notamment via ses acides aminés 31 à 61. Cette neurotoxicité est due à l'interaction de Tat avec les récepteurs N-méthyl-D-

aspartate (NMDAR) (Li et al., 2008; Nath et al., 1996). Le lien entre la protéine Tat du VIH-1 et un certain nombre de pathologies liées à l'infection fait de cette protéine une cible importante pour le développement de nouvelles thérapies.

4.1.2.3. Les modifications post-traductionnelles de Tat

Les modifications post-traductionnelles (PTM) sont des modifications covalentes des protéines qui impactent les propriétés des protéines cibles. De nombreuses PTM ont été identifiées dont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination ou encore la SUMOylation. Ces PTM se produisent au niveau d'acides aminés spécifiques par ajout d'un groupement chimique affectant la structure, la fonction ou encore la localisation des protéines modifiées. Ainsi, la protéine Tat du VIH-1 est elle aussi, soumise à diverses modifications post-traductionnelles (Figure 19). Dans cette partie, seules les PTM touchant à la protéine Tat du VIH-1 seront présentées. Des études ont par exemple démontré la phosphorylation de Tat du VIH-2 *in vivo* mais, pour l'instant, Tat du VIH-1 ne semble pas touché par cette modification (Herrmann and Rice, 1993).

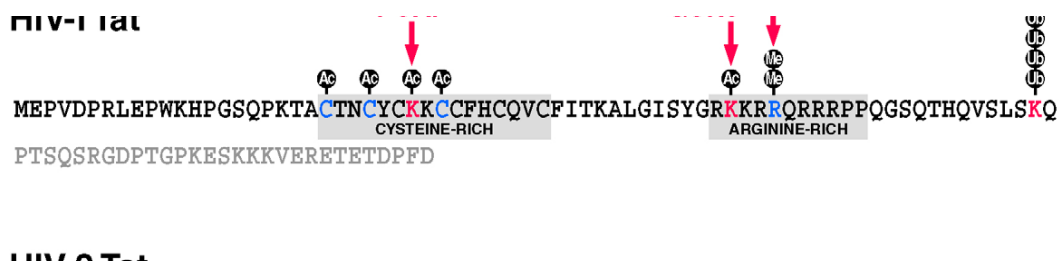


Figure 19 : Positionnement des modifications post-traductionnelles de Tat (Hetzer et al., 2005)

- L'acétylation

L'acétylation est une modification post-traductionnelle réversible qui neutralise la charge positive des lysines ciblées, ce qui affecte leur fonction (Choudhary et al., 2009). Le mécanisme s'effectue par transfert des groupements acétyle de l'acétyl-coenzyme A au groupe ϵ -amino des lysines cibles. p300/CBP et PCAF sont les principales HATs qui modifient Tat. p300/CBP acétyle Tat sur sa lysine 50 dans son domaine de liaison à la TAR. PCAF acétyle sa lysine 28 dans son domaine d'activation (Kiernan et al., 1999). L'acétylation sur la lysine 50 de Tat par p300/CBP permet sa

dissociation de la structure TAR des ARN viraux pendant le début de la phase d'élongation de la transcription. Ceci empêche également la formation du complexe Tat/TAR/CyclineT1. Puis, Tat acétylé se lie à l'ARN Pol II ainsi qu'à PCAF (Dorr et al., 2002; Kaehlcke et al., 2003; Mujtaba et al., 2002). PCAF et TAR entrent en compétition pour se lier au Tat acétylé en lysine 50. Tat peut être acétylé et deacétylé selon le moment du cycle viral et la fonction de Tat nécessaire à cette étape. Ainsi, Tat est deacétylé sur sa lysine 50 par SIRT1. Généralement, l'activité des HDACs est associée à un effet négatif sur la transcription. Mais la deacétylation de Tat par SIRT1 a un effet positif sur son activité de transactivation sur le LTR du VIH-1 (Pagans et al., 2005). La protéine p73 se lie à Tat et limite son acétylation sur la lysine 28. Cette protéine est impliquée dans l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire. La perte de cette interaction induit l'apoptose dans la cellule infectée (Amini et al., 2005). Enfin, la liaison entre Tat acétylé et p32, un cofacteur du facteur d'épissage ASF/SF-2, engendre une baisse de l'efficacité du mécanisme d'épissage (Berro et al., 2006).

- La méthylation

La méthylation consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur un acide aminé par une méthyltransférase qui modifie la charge de la protéine ciblée. Plus précisément, cette enzyme catalyse le transfert d'un ou plusieurs groupements méthyle du cofacteur S-adenosyl-L-méthionine (SAM) vers un acide aminé lysine ou arginine de la protéine cible. La protéine virale Tat est méthylée sur deux arginines et sur une lysine. L'ajout du groupement sur les arginines 52 et 53 du domaine de Tat riche en arginine se fait par la méthyltransférase PRMT6 (Boulanger et al., 2005; Xie et al., 2007). Cette modification induit une baisse de l'interaction entre Tat et la structure TAR, ce qui induit également une baisse de la formation des complexes cycline T1/Tat/TAR. Une étude a également démontré que cette méthylation permet de stabiliser Tat en induisant une baisse de sa dégradation par la voie du protéasome (Sivakumaran et al., 2009). Tat peut également être modifié sur sa lysine 51 dans son domaine de liaison à l'ADN par l'enzyme KMT7. Cette méthylation semble essentielle pour l'activité de transactivation de la protéine (Pagans et al., 2010).

- L'ubiquitination

L'ubiquitination est le processus par lequel une protéine ubiquitin d'environ 76 acides aminés est liée de façon covalente à une protéine cible via une liaison isopeptidique entre sa glycine C-terminale et le groupe ϵ -amino de la lysine de la protéine cible. L'ubiquitination est un processus multienzymatique qui nécessite l'action séquentielle d'enzymes, d'activation de l'ubiquitine E1, de conjugaison de l'ubiquitine E2 et de ligation de l'ubiquitine E3. La fonction la plus connue de cette modification est l'induction de la dégradation des protéines par la voie du protéasome. La monoubiquitination affecte souvent les processus cellulaires comme le trafic membranaire, le bourgeonnement viral, l'endocytose et la dégradation endosomale. La polyubiquitination est importante pour le processus de dégradation protéosomale, les ubiquitines forment entre elles des chaînes au niveau de leurs lysines 48. Généralement, les substrats polyubiquitinés sont adressés vers le protéasome 26S et dégradés (Lata et al., 2018). Dans le cas de la protéine virale Tat, l'effet de l'ubiquitination n'est pas la dégradation de la protéine mais la stimulation de la transcription. C'est la protéine Hdm2 qui induit l'ubiquitination de Tat sur la lysine 71. La mutation de cette lysine ou de Hdm2 ne modifie pas la stabilité de la protéine virale, ce qui démontre que dans ce cas précis, l'ubiquitination n'induit pas la dégradation de Tat (Brès et al., 2003).

4.2. Les mécanismes moléculaires de la latence post-intégrative du VIH-1

La latence post-intégrative du VIH-1 est due à une multitude de mécanismes qui permettent ensemble l'établissement et le maintien de la latence virale. Ainsi, contrairement à d'autres virus qui codent pour des protéines virales induisant la latence, pour le VIH-1 celle-ci s'explique par différents points (Figure 20).

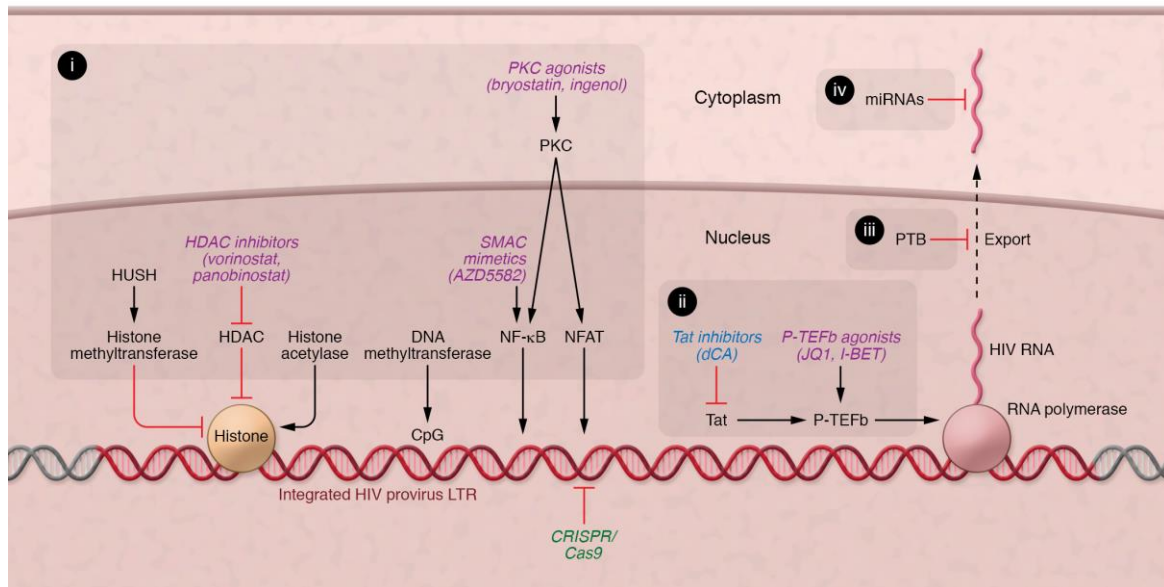


Figure 20 : Mécanismes de la latence virale et cibles thérapeutiques possibles (Dufour et al., 2020).

La répression de l'expression du VIH est régulée par des éléments de contrôle clés agissant sur l'initiation de la transcription, l'élongation de la transcription du VIH, l'exportation des ARN viraux et la dégradation de ces ARN (miARN). Les voies favorisant l'expression du VIH sont indiquées par des flèches noires, tandis que celles qui inhibent l'expression du VIH sont indiquées en rouge. Ces voies peuvent être ciblées par des molécules dans un but thérapeutique (en italique) afin d'inverser la latence du VIH (LRA, violet), de favoriser sa latence (LPA, bleu) ou de modifier son génome (CRISPR/Cas9, vert).

Le principal bloc dans l'expression du VIH-1 observé dans la latence post-intégrative s'effectue au niveau transcriptionnel.

Tout d'abord, le site d'intégration du VIH-1 influence l'expression des gènes viraux. Ainsi, de nombreuses études ont démontré que le génome du VIH-1 s'intègre dans les introns des gènes transcriptionnellement actifs contrairement à ce qui avait été supposé au début (Maldarelli et al., 2014; Wagner et al., 2014). Lorsque le génome est intégré dans la même orientation que les gènes actifs, l'interférence transcriptionnelle impacte de façon négative l'expression des gènes viraux (Lenasi et al., 2008).

Des études ont démontré que la transcription est un processus discontinu. Les gènes actifs peuvent avoir des périodes actives mais aussi inactives réparties aléatoirement. Ce phénomène est appelé «transcriptional noise» ou «gene bursting» (Chubb et al., 2006; Pichon et al., 2018; Rodriguez and Larson, 2020). Ce mécanisme de régulation pourrait jouer un rôle dans le contrôle de latence du VIH-1. L'étape de pause de l'ARN Pol II dans la transcription régule l'expression des gènes. Dans les cellules latentes,

cette pause est prolongée, ce qui maintient l'état de latence en empêchant donc l'expression du génome viral.

Ensuite, la transcription du VIH-1 dépend de la fixation de facteurs de transcription cellulaires. Celle-ci dépend de l'accessibilité du génome qui est contrôlée épigénétiquement. Le promoteur du VIH-1 est entouré par deux nucléosomes (nuc-0 et nuc-1) (Verdin et al., 1993) composés d'histones qui peuvent être modifiés par des marques épigénétiques activatrices (Lusic et al., 2003; Sheridan et al., 1997) ou répressives (Archin et al., 2009; Coull et al., 2000; Friedman et al., 2011). À ce jour, les principales marques épigénétiques associées à la latence post-intégrative du VIH-1 sont la deacétylation et la méthylation qui agissent principalement selon deux mécanismes. Elles peuvent impacter directement le compactage de la chromatine par des modifications des charges électrostatiques, ce qui induit une augmentation (formation d'euchromatine) ou une réduction (formation d'hétérochromatine) de l'accès de la chromatine aux différents facteurs. Mais ces modifications épigénétiques peuvent également induire de nouvelles interactions avec certaines protéines. Ainsi, les lysines acétylées sont reconnues par des protéines possédant un bromodomaine et les lysines méthylées sont reconnues par des protéines possédant un chromodomaine (pour revue (Bouchat and Lint, 2019)). L'état d'acétylation des histones est contrôlé par deux types d'enzymes : les histones acétyl-transférases (HATs) ou les histones désacétylases (HDACs) qui retirent le groupement acétyle déposé par les HATs. L'ajout de ce groupement modifie les interactions électrostatiques entre les histones et le squelette phosphodiester de l'ADN, induisant une ouverture de la chromatine et donc une induction de la transcription. Ainsi, la présence de HATs au niveau d'un promoteur est généralement associée à une transcription active. Au contraire, la présence de HDACs est plutôt associée à une répression de la transcription. Une étude a démontré le remodelage du nucléosome nuc-1 couplé à une activation de l'expression des gènes du VIH-1 par traitement avec des inhibiteurs de HDACs (Van Lint et al., 1996). À l'état de latence, les HDACs recrutées par certains facteurs fixés sur le promoteur viral dont CTIP2 participent à l'inhibition de l'expression du VIH-1 (Marban et al., 2007; Verdin et al., 1993). La méthylation est contrôlée par des méthyltransférases. Selon la marque de méthylation déposée, l'effet sur la transcription sera positif ou négatif. Contrairement à l'acétylation qui modifie les interactions protéines/ADN, la méthylation modifie la structure de la

chromatine par recrutement de protéines qui transformeront l'environnement chromatinien. Ainsi, la méthylation participe également à la répression de l'expression des gènes du VIH-1 via deux histone méthyltransferases (HTMs), Suv39H1 (Marban et al., 2007) et G9a (Imai et al., 2010). Elles ciblent la lysine 9 de l'histone H3 et induisent respectivement une triméthylation et une diméthymation. De plus, la lysine 27 est également ciblée dans les cellules T par EZH2 qui induit une triméthylation participant également à la latence virale (Friedman et al., 2011).

La méthylation des îlots CpG du promoteur maintient la répression de l'expression du VIH-1 (Kauder et al., 2009). Pour ce faire, les ADN méthyltransferases (DNMT) transfèrent un groupement méthyle du cofacteur SAM vers le carbone en position 5 d'un résidu cytosine localisé au sein de dinucléotides CpG. La méthylation de l'ADN interfère directement avec la transcription en empêchant la liaison de facteurs de transcription. Mais elle peut aussi avoir un effet indirect par la liaison de protéines qui se lient aux îlots méthylés, qui elles-mêmes recrutent des enzymes qui induiront la formation d'hétérochromatine. La méthylation de l'ADN au niveau du LTR 5' est un événement qui intervient plus tardivement et n'est pas essentiel à l'initiation de l'établissement de la latence virale. Cependant, une étude a démontré que lorsque la latence est contrôlée uniquement par les mécanismes relatifs à l'état de la chromatine et par l'interférence transcriptionnelle, la réactivation de l'expression des gènes viraux s'effectue plus facilement que lorsque le promoteur est méthylé au niveau de ses îlots CpG (Blazkova et al., 2009). En revanche, la présence de cette modification de l'ADN n'empêche pas totalement la réactivation. Il est donc possible de cibler la méthylation de l'ADN dans un but de réactivation des réservoirs. Cependant, différentes études ont démontré des profils de méthylation différents au niveau du LTR 5', ne permettant pas de conclure de façon stricte que l'hyperméthylation des îlots CpG participe à la latence virale. La méthylation de l'ADN peut varier au cours du temps mais aussi en fonction des types cellulaires étudiés et principalement aussi en fonction des patients (Weber et al., 2014).

Enfin, comme décrit précédemment, l'initiation de la transcription dépend du recrutement de facteurs de transcription comme Sp1, AP-1, NFAT et NF-kB (Van Lint et al., 1997). Le facteur de transcription NF-kB joue également un rôle dans l'élongation de la transcription, en recrutant PTEF-b. Dans les cellules quiescentes,

NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par son inhibiteur I κ B α . Lorsque ces cellules sont stimulées, I κ B α est phosphorylé, ce qui induit la dissociation de NF- κ B avec son inhibiteur et la translocation du facteur de transcription dans le noyau afin qu'il puisse exercer son activité d'activation de la transcription (Barboric et al., 2001; Perkins et al., 1997).

En plus de l'effet de la transcription des gènes viraux, la latence est également contrôlée par des mécanismes qui agissent en aval de la transcription.

Le génome viral permet la synthèse d'une multitude de transcrits, non épissés, mono-épissés ou multi-épissés permettant la synthèse des différentes protéines virales. Un problème d'épissage peut induire une absence de synthèse des protéines virales dont Tat (Yukl et al., 2018). Les cellules latentes expriment la protéine PTB (polypyrimidine tract-binding protein) qui induit un défaut dans l'export des ARN viraux du noyau vers le cytoplasme (Lassen et al., 2006). Enfin, des microARN peuvent empêcher la traduction des transcrits viraux. Ils maintiennent la latence virale en ciblant la partie 3' des transcrits. Plusieurs microARN ont été décrits comme impliqués dans la latence virale : miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223, miR-382 (Huang et al., 2007) et miR-29a (Ahluwalia et al., 2008).

Les cellules infectées latentes sont maintenues par différents signaux, à la fois par des signaux de survie cellulaire, empêchant les cellules infectées par le VIH de mourir, et par des signaux de division cellulaire favorisant l'expansion des clones infectés par le VIH (Chomont et al., 2009, 2011). Ainsi différentes études ont clairement démontré que des expansions clonales se produisent dans les réservoirs du VIH suite à l'observation de duplication des sites d'intégration du VIH et/ou de la duplication des génomes viraux (Gantner et al., 2020). Ces clones infectés croissent et décroissent et donnent un groupe dynamique de cellules infectées au fil du temps (Josefsson et al., 2013; von Stockenstrom et al., 2015; Wang et al., 2018). Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer la dynamique des réservoirs viraux, principalement la prolifération induite par l'antigène (Henrich et al., 2017; Mendoza et al., 2020; Simonetti et al., 2016) mais aussi la prolifération homéostatique (Chomont et al., 2009; Hosmane et al., 2017; Wang et al., 2018) et la prolifération induite par l'intégration du VIH dans des gènes cellulaires impliqués dans la prolifération cellulaire (Cesana et al., 2017; Maldarelli et al., 2014; Wagner et al., 2014). Une étude récente s'est penchée sur la

dynamique des réservoirs lymphocytes sous cART (Gantner et al., 2020). L'expansion clonale contribue activement à la persistance des réservoirs du VIH. Les cellules des réservoirs avec un phénotype différencié sont la descendance des cellules de la mémoire infectées subissant une expansion clonale induite par l'antigène sous ARV. Ainsi, même sous ARV, les cellules infectées latentes des réservoirs sont extrêmement dynamiques et leur expansion clonale participe activement à la persistance du VIH dans l'organisme des patients infectés. Il est donc nécessaire de développer des stratégies thérapeutiques qui ciblent ces mécanismes afin de limiter la dynamique des réservoirs et de diminuer le nombre de cellules présentes dans les réservoirs.

Dans les cellules microgliales, différents mécanismes permettent d'expliquer la latence post-intégrative du VIH-1.

4.2.1. L'établissement et le maintien de la latence dans les cellules microgliales

Le facteur de transcription cellulaire CTIP2 (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2) joue un rôle primordial dans l'établissement et le maintien de la latence virale post-intégrative des cellules microgliales. CTIP2 aussi appelé BCL11b est un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines à doigts de zinc. Il possède différents domaines de liaison à l'ADN (doigt de zinc) ainsi que des domaines permettant l'interaction avec d'autres protéines (Figure 21) (pour revue (Le Douce et al., 2014)). Ainsi CTIP2 peut réguler la transcription des gènes en se fixant directement sur le promoteur via des séquences spécifiques ou en se fixant à des facteurs de transcription eux-mêmes liés au promoteur comme Sp1 (Avram et al., 2000, 2002; Marban et al., 2005).

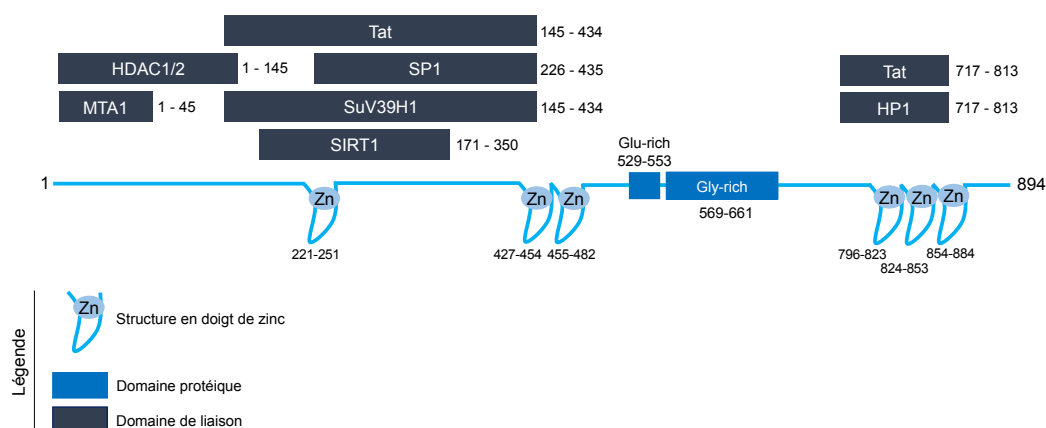


Figure 21 : Structure de la protéine CTIP2 et domaines de liaison aux protéines impliquées dans la latence virale (d'après (Le Douce et al., 2014)).

Dans un premier temps l'activité du promoteur viral dépend de son environnement chromatinien. Ainsi, dans les cellules microgliales, CTIP2 fixé aux sites Sp1 du LTR sert de plateforme d'ancrage à un complexe modificateur de la chromatine qui favorise la formation d'hétérochromatine au voisinage du promoteur viral (Figure 22a). Les HDAC1 et HDAC2 permettent la déacétylation de la lysine 9 de l'histone 3 puis le recrutement de Suv39H1 qui entraîne le dépôt de la marque répressive H3K9me3. Celle-ci favorise le recrutement de la protéine HP1 et par conséquent l'induction de la formation d'hétérochromatine (Marban et al., 2007). De plus, dans les cellules microgliales, LSD1 recrute au niveau du promoteur viral hSet1 et WDR5 qui induisent le dépôt de la marque H3K4me3. L'association des marques H3K9me3 et H3K4me3 dans les cellules microgliales permet la formation d'hétérochromatine et l'inhibition de la transcription des gènes du VIH-1. (Le Douce et al., 2012).

D'autre part, CTIP2 est également impliqué dans le maintien de la latence virale. En effet, les virus intégrés latents persistent dans les cellules réservoirs par un mécanisme spécifique ciblant PTEF-b. L'activation de la transcription des gènes du VIH-1 est particulièrement sensible au facteur d'élongation cellulaire PTEF-b. Sans recrutement de ce facteur, les gènes viraux ne peuvent être transcrits. La protéine virale Tat joue un rôle majeur dans le recrutement de PTEF-b pour activer la transcription du virus. Tat se lie à la région TAR (Trans-activation response element) des ARN viraux pour y recruter PTEF-b. Dans le contexte de latence, CTIP2 recruté par HMGA1 au niveau du promoteur, séquestre le facteur PTEF-b (Cycline T1 et CDK9) dans un complexe

inactif comprenant l'ARN cellulaire non codant 7SK et la protéine HEXIM (Figure 22b). Il inhibe l'activité kinase portée par Cdk9 qui empêche l'activation de l'ARN Pol II en inhibant sa phosphorylation ainsi que celle de NELF et DSIF. Il contribue ainsi à limiter le recrutement de PTEF-b actif par Tat et réduit l'expression des gènes viraux (Cherrier et al., 2013; Eilebrecht et al., 2014). Récemment, il a été démontré que l'activité répressive de CTIP2 pouvait être modulée par phosphorylation ou SUMOylation (Dubuissez et al., 2016).

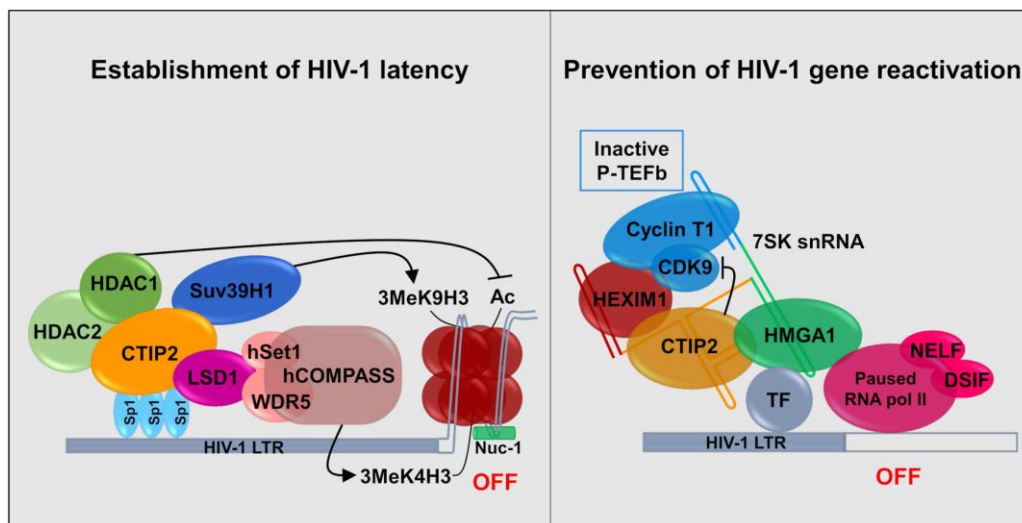


Figure 22 : Complexes recrutés au niveau du promoteur du VIH-1 permettant l'établissement et le maintien de la latence virale dans les cellules microgliales (Wallet et al., 2019).

CTIP2 étant un acteur central de la latence du VIH-1, des études ont analysé et quantifié sa présence dans différents cellules et tissus. Juan Wang et al. ont étudié l'expression de CTIP2 (ARNm) dans les LTCD4⁺ de différents groupes de patients (patients non infectés, patients VIH⁺ non traités et patients VIH⁺ traités). Ils ont constaté des niveaux élevés d'ARNm CTIP2 chez les patients traités pour le VIH par rapport aux deux autres groupes. Ces niveaux de CTIP2 sont aussi associés à des niveaux élevés de facteurs modifiant la chromatine associés à CTIP2, notamment HDAC2, SUV39H1 et HP1 (Wang et al., 2020). Paula Desplats et al. ont étudié l'expression de CTIP2 dans différents tissus du SNC mais aussi dans le liquide céphalorachidien de 3 groupes de patients définis en fonction de leur niveau en ADN VIH, ARN VIH et p24. Le groupe contrôle VIH⁺ (pas d'ADN, d'ARN ou de p24 détectable), le groupe VIH⁺ latent (taux d'ADN élevé mais pas d'ARN ou de p24 détectable) et le groupe encéphalite VIH ou HIVE (taux détectables d'ADN, d'ARN et

de p24). Ils ont montré que les niveaux d'expression de CTIP2 augmentent dans le cortex frontal, la matière blanche et les cellules microgliales de sujets infectés latents par rapport aux groupes contrôle et encéphalite. Ils ont également démontré que le niveau de CTIP2 dans le liquide céphalorachidien est le plus élevé chez les sujets latents et très faible chez les sujets HIVE (Desplats et al., 2013). Ainsi, CTIP2 peut être considéré comme un marqueur de la latence du VIH-1, ce qui sera confirmé par la suite (Cysique et al., 2019).

4.3. Les nouvelles stratégies de guérison

Les réservoirs du VIH-1 notamment les cellules microgliales du SNC sont donc un obstacle majeur à l'éradication du VIH-1 de l'organisme. Éliminer ces cellules latentes permettrait d'obtenir une guérison, ou à minima une rémission. De plus, la présence de virus latents dans le SNC induit une inflammation chronique notamment par la présence de protéines virales comme Nef, Tat, Rev ou Vpr. Ces protéines activent les macrophages anti-inflammatoires via des cytokines pour modifier leur phénotype et devenir pro-inflammatoires. La production du virus dans les cellules microgliales est associée au développement de HAND. Il est donc nécessaire de purger les réservoirs afin de limiter ces effets secondaires de la neuroinflammation observée malgré la prise d'antirétroviraux (Sutherland and Brew, 2018). Mais cibler ces cellules situées dans des sanctuaires viraux semble compliqué. Plusieurs obstacles et considérations sont à prendre en compte. En suivant le modèle des contrôleurs élités qui vivent infectés par le VIH-1 sans traitement et avec une charge virale très faible, plusieurs stratégies ont été proposées (Figure 23) : la stratégie *Shock and Kill*, la stratégie *Block and Lock* et la thérapie génique (pour revue (Wallet et al., 2019)). Le but de ces stratégies est de moduler les réservoirs qui sont la source du rebond de virémie.

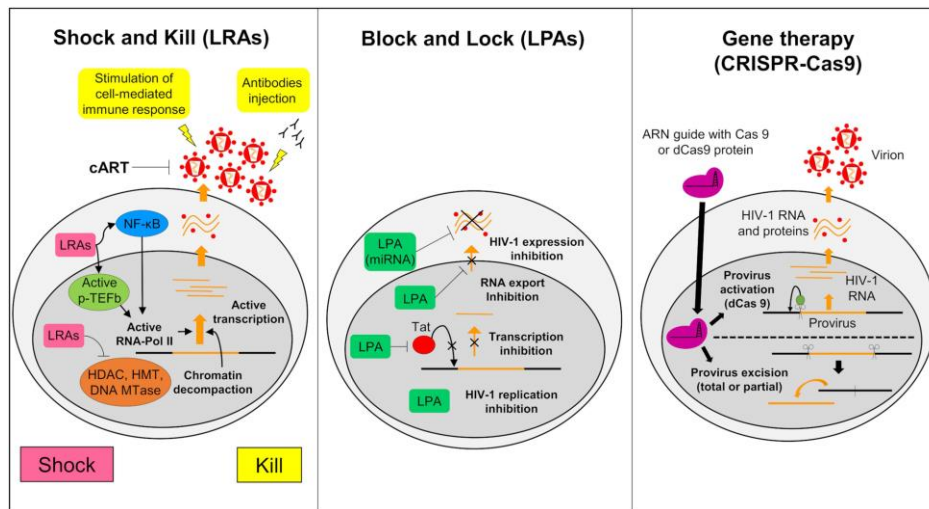


Figure 23 : Fonctionnement des trois nouvelles stratégies pour éliminer ou réduire les réservoirs viraux (Wallet et al., 2019).

4.3.1. La stratégie *Shock and Kill*

Cette stratégie a pour but de réactiver l'expression virale dans les cellules latentes grâce à des molécules appelées *Latency reversing agents* (LRAs) qui ciblent les mécanismes d'établissement et de maintien de la latence dans les réservoirs. Dans un même temps, la cART est maintenue afin que les virus nouvellement synthétisés n'infectent pas les cellules voisines saines. De plus, le système immunitaire et notamment les lymphocytes cytotoxiques sont stimulés pour éliminer les cellules réactivées (Schwartz et al., 2017). Cette stratégie nécessite une étude extrêmement précise des mécanismes qui régissent la latence virale afin de développer les LRAs. Différents types de LRAs sont déjà disponibles. On retrouve des inhibiteurs de HDACs (acide valproïque, Vorinostat, panobinostat, romidepsine), les inhibiteurs d'histone méthyltransférases (chaetocine et BIX 01294) ou des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN (5-AzadC). La prostratine, la bryostatine et l'ingénol B activent la voie PKC et libèrent les facteurs NF-κB et PTEF-b des complexes inactifs, ce qui conduit à la réactivation du VIH-1. JQ-1, un inhibiteur de bromodomaine permet également de libérer PTEF-b. Cependant, ces LRAs utilisés seuls ne permettent pas de réactiver de façon satisfaisante l'expression du VIH-1. Cette observation confirme le fait que la latence virale est multifactorielle. De ce fait, les études se concentrent désormais sur des combinaisons de LRAs afin d'obtenir un effet synergique. Le but est d'augmenter l'efficacité de réactivation et de réduire la toxicité de ces molécules en utilisant des

doses plus faibles (pour revue (Sengupta and Siliciano, 2018)). Une étude récente suggère que l'effet de synergie observé par la combinaison de différents LRAs pourrait s'expliquer par le fait que les différentes cellules infectées de manière latente sont réactivées de façon plus ou moins efficace par chaque LRA (Sannier et al., 2021). Le but final de cette stratégie serait également de fournir un traitement personnalisé aux personnes infectées par le VIH-1. Comme décrit précédemment, les réservoirs sont extrêmement hétérogènes par leur localisation mais aussi par les mécanismes qui régissent la latence virale. Ainsi, la réactivation de ceux-ci par les LRAs peut varier en fonction des individus. Il serait donc envisageable de tester *in-vivo* la combinaison de LRAs efficace pour un patient avant de passer à la phase de traitement.

4.3.2. La stratégie *Block and Lock*

La transcription résiduelle observée dans les réservoirs est responsable d'une activation chronique du SI, ce qui peut induire des comorbidités non-liées au SIDA. Ainsi l'activation immunitaire et l'inflammation persistante entraînent par exemple un dépôt de collagène dans le tissu lymphoïde et une perturbation progressive de l'architecture des ganglions lymphatiques (Massanella et al., 2016). Le but de la stratégie *Block and Lock* est d'empêcher l'expression du VIH-1 des réservoirs à l'aide de molécules appelées *Latency Promoting Agents* (LPAs) et donc de limiter les problèmes liés à l'inflammation. Ces LPAs induisent une latence profonde en supprimant l'expression des gènes du VIH-1 (*block*) puis en empêchant la transcription des gènes viraux (*lock*) (pour revue (Castro-Gonzalez et al., 2018)). Un LPA très prometteur a été identifié : le didehydro-Cortistatin A (dCA). Le dCA est un inhibiteur de Tat qui se lie au domaine de liaison de Tat à la TAR, ce qui bloque l'étape d'élongation de la transcription. Récemment Kessing et al., ont démontré que l'association du dCA avec des ARV permet la suppression de l'expression VIH-1 et prévient le rebond viral après l'interruption des ARV, même lors d'une forte activation cellulaire (Kessing et al., 2017).

4.3.3. La thérapie génique

Finalement, la dernière stratégie proposée pour lutter contre l'infection par le VIH-1 est la thérapie génique. Le premier cas de guérison établie du VIH-1 est basée sur une thérapie génique, c'est le «patient de Berlin». Cette personne a subi une transplantation de cellules souches hématopoïétiques ayant une mutation pour le récepteur CCR5 (CCR532). Elle confère une résistance des cellules à l'infection par le VIH-1. Cependant, ce cas de guérison a fait appel à un processus complexe qui ne peut être appliqué à toutes les personnes infectées par le VIH car trop risqué et très coûteux. Trois outils sont disponibles pour les essais de thérapie génique : ZFN1 ; TALEN ; CRISPR/Cas9 (Panfil et al., 2018; Wang et al., 2018). Les deux premières techniques sont assez coûteuses et demandent beaucoup de temps contrairement à la nouvelle technique, CRISPR/Cas9. De nombreuses études se penchent sur l'utilisation de cet outil. Le but est de cibler l'ADN viral intégré ou encore le gène qui code pour le récepteur d'entrée CCR5. Une étude a même couplé la technique CRISPR/Cas9 avec des LRAs dans un but de stratégie *Shock and Kill* (Limsirichai et al., 2016). Ils ont utilisé la technique CRISPR/Cas9 pour activer l'expression des gènes viraux dans des modèles de lignées cellulaires de latence du VIH-1. Ils ont également démontré la complémentarité des activateurs Cas9 avec des LRAs pour favoriser l'activation de l'expression des gènes viraux. Une autre stratégie est également à l'étude, la thérapie *Suicide Gene*. Cette thérapie initialement testée dans le traitement des cancers pourrait être appliquée à l'infection par le VIH-1. Le but de cette thérapie est d'introduire un gène suicide dans une cellule cible afin d'induire l'expression d'une enzyme spécifique, d'une toxine ou d'une protéine pro-apoptotique qui induirait la mort de la cellule ciblée. Dans le cas du VIH-1, l'objectif serait de cibler les cellules infectées latentes.

4.3.4. Les limites de ces stratégies

Les nouvelles stratégies pour cibler le VIH-1 sont encore en phase d'étude notamment en raison des limites qu'elles imposent. Les cellules microgliales sont situées dans un sanctuaire virologique, ce qui engendre une faible pénétration des molécules antirétrovirales par la présence de la BHE. Ainsi, de nombreux travaux se concentrent sur le développement de nouvelles molécules qui traversent efficacement la BHE. De nouvelles voies d'administration qui permettrait de contrecarrer l'effet de

la BHE comme par exemple la voie nasale sont également à l'étude (pour revue (Wallet et al., 2019)).

Appliquée au SNC, la stratégie *Shock and Kill* pourrait se révéler intéressante afin de limiter les problèmes neurocognitifs associés à la présence du VIH-1 dans cet organe. Cependant plusieurs limites et questions se posent en raison de la spécificité du SNC (pour revue (Marban et al., 2016)).

- Il est tout d'abord nécessaire de prendre en compte la présence de la BHE qui limite l'accès au SNC de nombreuses molécules. Ainsi, les futurs LRAs doivent pouvoir passer cette barrière pour avoir un effet sur les réservoirs présents dans le cerveau.
- La stratégie *Shock and Kill* prévoit le maintien des ARV afin de limiter l'infection de nouvelles cellules. Dans le SNC, les principales cellules réservoirs du VIH-1 sont les macrophages périvasculaires et les cellules microgliales. Il est donc important d'intégrer des ARV qui ciblent les macrophages et qui passent la BHE (Watters et al., 2013).
- L'activation des lymphocytes T cytotoxiques est nécessaire pour éliminer les cellules infectées réactivées or le SNC est un site immunoprivilégié. Cette activation pourrait induire une inflammation qui serait délétère pour le cerveau.
- Enfin, la réactivation des réservoirs par les LRAs induira la synthèse de protéines virales neurotoxiques telles que Tat ou encore gp120. Aucune molécule actuellement disponible ne permet pour l'instant d'inhiber la transcription ou Tat.

L'une des alternatives possibles, serait, de combiner la stratégie *Shock and Kill* en première intention suivie de la stratégie *Block and Lock*. La première permettrait de réactiver tous les réservoirs possibles afin de diminuer leur taille puis la deuxième bloquerait de façon définitive les réservoirs résistant à la réactivation (Wallet et al., 2019).

Enfin, la thérapie génique présente les mêmes limites que les autres stratégies, c'est à dire, la pénétration des composants du système CRISPR/Cas9 dans le SNC et l'inflammation induite. A l'instar des autres stratégies, un développement de variants du VIH-1 résistant aux mécanismes CRISPR/Cas9 a été observé pour cette stratégie (Wang et al., 2018).

Il est donc nécessaire de poursuivre les efforts de recherche pour toutes ces stratégies dans le but de cibler ces réservoirs qui restent le principal frein à la guérison du VIH.

5. La SUMOylation

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle présente chez tous les eucaryotes et découverte dans les années 1990 initialement chez *Saccharomyces cerevisiae* (Kamitani et al., 1997; Matunis et al., 1996; Meluh and Koshland, 1995). Le nom SUMO pour *Small ubiquitin-like modifiers* vient d'une similitude avec l'ubiquitination à laquelle la SUMOylation est souvent comparée du fait de la ressemblance des mécanismes de conjugaison. Cette modification post-traductionnelle réversible est extrêmement conservée et essentielle au bon développement des organismes (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Ainsi, une étude a démontré que des embryons de souris déficients pour la SUMOylation (absence d'UBC9) ne survivent pas après l'étape d'implantation et il semblerait que l'isoforme SUMO2 soit essentiel au développement embryonnaire (Wang et al., 2014). De plus, les cellules déficientes en UBC9, principale enzyme de la SUMOylation, présentent de nombreux dysfonctionnements notamment du point de vue de l'organisation nucléaire (Nacerddine et al., 2005). La SUMOylation régule de nombreux processus cellulaires, principalement nucléaires, dont la réplication, la réparation de l'ADN, la transcription ou encore la prolifération cellulaire. Elle peut ainsi modifier la localisation de sa cible, son activité ou encore sa stabilité et donc ses interactions avec d'autres protéines (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007). Elle consiste classiquement en la fixation de façon covalente d'une protéine SUMO. Cependant, certaines protéines contiennent des motifs d'interaction SUMO (SIM) qui permettent leur interaction non covalente avec les protéines SUMOylées.

5.1. Le mécanisme de SUMOylation et les enzymes associées

5.1.1. Le cycle de SUMOylation

La SUMOylation consiste en l'attachement de façon covalente d'un isoforme SUMO d'environ 12 kDa sur un résidu lysine d'une protéine cible. Le cycle de SUMOylation (Figure 24) implique une cascade de réactions enzymatiques et fait intervenir différentes enzymes.

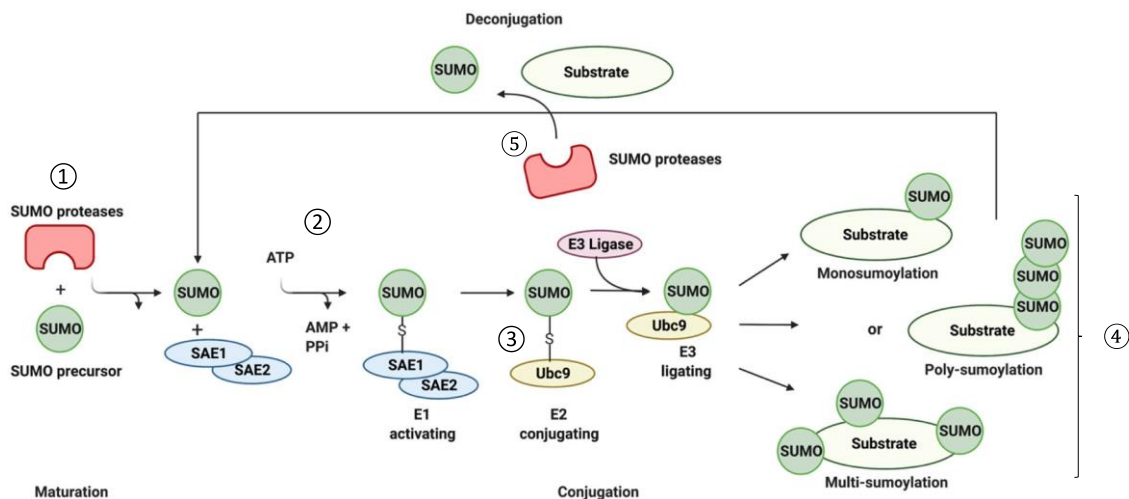


Figure 24 : Mécanisme de la SUMOylation (Imbert and Langford, 2021).

Afin que le processus puisse s'initier il faut que le précurseur SUMO soit mûré (Fig. 24 ①). Pour ce faire des protéases spécifiques, les SENP (sentrin/SUMO-specific protease) clivent des acides aminés en C-terminal du précurseur afin d'exposer un motif di-glycine «Gly-Gly» qui permet à SUMO d'être conjugué à la lysine de la protéine cible. Les SENP clivent 4 acides aminés pour SUMO1, 11 acides aminés pour SUMO2 et 2 acides aminés pour SUMO3. Après l'étape de maturation, la protéine SUMO doit être activée de façon ATP-dépendante par l'enzyme E1 (Fig. 24 ②). Cette enzyme est composée du dimère SAE (SUMO-activating enzyme) 1 et 2. Lors de cette étape, s'établit une liaison thioester entre la cystéine 173 du site actif de SAE2 et un résidu glycine en Cter de la protéine SUMO. Puis SUMO est conjugué à l'enzyme E2 de conjugaison, UBC9, par une liaison thioester au niveau de sa cystéine catalytique (Cys93) (Fig. 24 ③). Enfin, SUMO est transféré par UBC9 sur la protéine cible (Fig. 24 ④). Une liaison isopeptidique est formée entre la glycine en Cter de SUMO et le groupement ϵ -amine de la lysine acceptrice de la protéine cible. Cette dernière étape peut être directe ou facilitée par les enzymes E3 qui guident UBC9 vers sa lysine cible (pour revue (Pichler et al., 2017)). Une protéine peut être SUMOylée par un seul isoforme SUMO ou plusieurs, qui forment des chaînes. De plus, la SUMOylation est un mécanisme extrêmement dynamique, ainsi la balance SUMOylation /déSUMOylation des protéines est en constante évolution. Les SUMO protéases clivent la liaison isopeptidique entre SUMO et le substrat, ce qui modifie constamment l'équilibre entre le pool de SUMO libres et celui de SUMO conjugués (Fig. 24 ⑤).

5.1.2. L'enzyme E2 de conjugaison

L'enzyme de conjugaison E2, UBC9 a un rôle essentiel dans le mécanisme de SUMOylation. UBC9 est la seule enzyme E2 capable d'effectuer la conjugaison de SUMO à sa cible. UBC9 interagit avec E1 pour fixer la protéine SUMO et former une liaison thioester SUMO~Ubc9. Puis UBC9 chargé interagit avec le substrat mais également avec une enzyme E3 pour le transfert du résidu SUMO sur le substrat. Ainsi, UBC9 possède la capacité d'interagir avec différentes protéines (Figure 25) (Varejão et al., 2020). Certains résidus au sein du site actif E2, à savoir Tyr87, Cys93, Asn85 et Asp127, sont essentiels à son activité catalytique (Hayashi et al., 2002; Nacerddine et al., 2005; Nowak and Hammerschmidt, 2006).

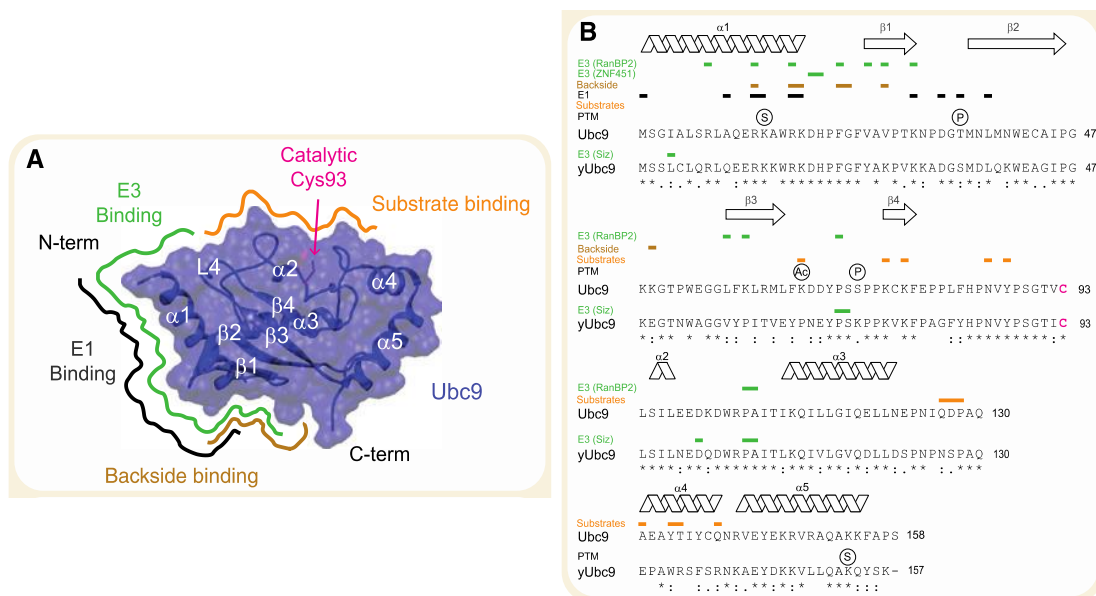


Figure 25 : Domaines d'interactions d'UBC9

(A) Interfaces des liaisons sur la surface d'UBC9. Le domaine N-terminal de UBC9 lie E1 (ligne noire) et les E3 (ligne verte). La fente catalytique E2 autour de Cys93 permet les liaisons E2-substrat. La face arrière de UBC9 opposée à son centre catalytique, lie SUMO (ligne brune). (B) Alignement de séquences de UBC9 Humain (et levure) avec les caractéristiques structurales indiquées. Les acides aminés impliqués dans les interactions sont représentés dans la même couleur qu'en (A). Les aa qui sont des cibles de modifications sont indiqués, Ac pour l'acétylation, S pour la SUMOylation et P pour la phosphorylation (Pichler et al., 2017).

5.1.3. Les SENP

La liaison aux protéines cibles d'un ou plusieurs isoformes SUMO peut être supprimée par une famille de protéases à cystéine appelées SENP. Le génome humain code six SENP : SENP1/2/3 et SENP5/6/7. Mais des études plus récentes ont

identifié trois nouvelles SUMO protéases chez l'Homme, DESI1, DESI2 ainsi que USPL1 (Schulz et al., 2012; Shin et al., 2012). Chacune de ces enzymes a sa propre fonction et localisation subcellulaire (Tableau 1). Comme indiqué précédemment, certaines SENP permettent la maturation des précurseurs SUMO. D'autres permettent la déconjugaison des isoformes SUMO des substrats et dépolymérisent les chaînes polySUMO2/3. SENP1 a une préférence pour SUMO1, alors que les autres membres de la famille SENP ont une préférence pour SUMO2/3. SENP 6 et 7 semblent spécifiques à la régulation de la formation des chaînes SUMO. Elles régulent ainsi dans certains cas la dégradation des protéines SUMOylées par la voie du protéasome (pour revue (Hickey et al., 2012)).

Name	Subcellular localization*	Isoform preference	Precursor processing	Deconjugation	Chain editing‡
Mammals					
SENP1	Nuclear pore and nuclear foci	SUMO1 and SUMO2/3	Yes	Yes	No
SENP2§	Nuclear pore and nuclear foci; cytoplasm	SUMO2/3 > SUMO1	Yes	Yes	No
SENP3	Nucleolus	SUMO2/3	Unknown	Yes	No
SENP5	Nucleolus and mitochondria	SUMO2/3	Yes	Yes	No
SENP6	Nucleoplasm	SUMO2/3	No	Yes	Yes
SENP7	Nucleoplasm	SUMO2/3	No	Yes	Yes
DESI1	Cytoplasm and nucleus	SUMO1 and SUMO2/3	Weak	Yes	Weak
DESI2	Cytoplasm	Unknown	No	Unknown	Unknown
USPL1	Cajal bodies	SUMO2/3 > SUMO1	Weak	Yes	Yes

Tableau 1 : Liste des différentes SENP avec leurs localisations cellulaires et leurs fonctions (d'après (Hickey et al., 2012)).

* Les localisations subcellulaires principales sont listées mais des fractions mineures peuvent être observées ailleurs. ‡ L'édition de chaînes fait référence à la capacité d'une SENP à éliminer un ou plusieurs SUMO d'une chaîne poly-SUMO en conservant tout de même une partie de la chaîne. § SENP2 a au moins trois variants d'épissage qui localisent différemment.

5.2. Les motifs de SUMOylation

5.2.1. Les sites consensus de SUMOylation

La modification post-traductionnelle des protéines par la SUMOylation s'effectue uniquement sur les lysines des protéines cibles. Il existe un motif consensus central appelé SCM pour *SUMO consensus motif*. Fréquemment retrouvé au niveau des sites de SUMOylation, il permet la conjugaison de façon covalente d'une protéine SUMO à une protéine cible. Ce motif Ψ -K-x-D/E reconnu par UBC9 est composé d'un résidu

hydrophobe (Ψ), de la lysine cible de la SUMOylation (K), de n'importe quel acide aminé (x) et enfin d'un acide aspartique (D) ou d'un acide glutamique (E). Les résidus du motif interagissent directement avec UBC9 et ont un rôle important dans la stabilité de l'interaction entre UBC9 et la protéine SUMOylée. Lors de la SUMOylation, le motif consensus adopte une conformation plus étendue, ce qui permet de positionner la lysine acceptrice proche du site actif de UBC9 situé dans une région hydrophobe. Cette étape induit la mise en place de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques pour augmenter la reconnaissance UBC9/motif (Gareau and Lima, 2010). Ce motif consensus est fréquemment retrouvé dans les protéines SUMOylées, cependant, toutes ne présentent pas ce motif. Dans des conditions physiologiques, environ la moitié des protéines SUMOylées présentent le motif SCM. En revanche dans des conditions de stress comme un dommage à l'ADN ou encore une infection virale, il a été démontré que beaucoup de lysines cibles de la SUMOylation ne sont pas comprises dans le motif SCM (Pichler et al., 2017). De plus, le motif consensus peut être positionné au niveau de structures secondaires dont des structures en boucle. De ce fait, la SUMOylation de ces protéines dépend de l'accès au motif par UBC9, qui peut donc dans certains cas être limité (Anckar et al Mol and Cell Biology 2006). Enfin, d'autres motifs existent, notamment le motif PDSM (Phosphorylation-Dependent Sumoylation Motif), le motif NDSM (Negatively Charged Amino Acid-Dependent Sumoylation Motif) (Pichler et al., 2017) et le motif HCSM (Hydrophobic Cluster Sumoylation Motif) (Matic et al., 2010) qui sont des extensions du motif consensus.

Le motif PDSM, Ψ -K-x-E-x-x-S-P est composé du site consensus suivi d'un site de phosphorylation composé d'une sérine et d'une proline. La phosphorylation des résidus Ser et Pro (SP) voisins du site consensus de la SUMOylation augmente le taux de SUMOylation. Ce motif a d'abord été découvert dans les facteurs de choc thermique (heat shock factors) puisque le stress induit une augmentation des niveaux de phosphorylation et de SUMOylation, notamment via le motif PDSM. Cependant, ce motif a également été identifié chez plusieurs facteurs de transcription où la phosphorylation suivie de la SUMOylation induit une répression. La phosphorylation induit l'ajout de charges négatives autour de la lysine cible, ce qui semble augmenter l'interaction entre la lysine et UBC9. Ce mécanisme est également retrouvé pour le motif NDSM (Hietakangas et al., 2006; Mohideen et al., 2009; Picard et al., 2012).

Le motif NDSM Ψ -K-x-E-x-x-E-E-E-E, est constitué d'une dizaine d'acides aminés autour du motif consensus. Les acides aminés acides en aval du motif consensus permettent à ce motif d'être chargé négativement, ce qui augmente la liaison entre la protéine cible et UBC9. La reconnaissance au niveau de UBC9 se fait grâce à une région basique en aval du site de SUMOylation de la protéine. Cette deuxième interaction permet donc de renforcer la SUMOylation par des interactions électrostatiques. De plus, il a été démontré que 81% des protéines présentant un motif NDSM étaient SUMOylées. Ce motif permet donc de mieux prédire la possible SUMOylation d'une protéine par rapport au motif central (Yang et al., 2006).

Finalement, comme indiqué précédemment la présence de ces motifs n'est pas indispensable à la SUMOylation. Certaines protéines sont SUMOylées sur des lysines qui ne sont comprises dans aucun motif connu à ce jour. De même la présence de ces motifs dans des protéines non SUMOylées démontre que leur simple présence ne définit pas la susceptibilité d'un substrat à la SUMOylation (Gareau and Lima, 2010; Pichler et al., 2005, 2017).

5.2.2. Les SIM : motifs d'interaction SUMO.

Alors que les motifs consensus SUMO facilitent les interactions covalentes entre un isoforme SUMO et le substrat, des motifs d'interaction SUMO (SIM) permettent des interactions non covalentes entre les SUMO de protéines SUMOylées et des protéines contenant ces SIM. Ces motifs consistent généralement en plusieurs résidus hydrophobes avec un résidu ou une région acide proche. Ce noyau forme un brin- β qui peut s'insérer dans un sillon hydrophobe entre une hélice- α et un brin- β d'un isoforme SUMO. Ils ont été identifiés dans de nombreuses protéines, y compris les enzymes SUMO, les substrats SUMO, les protéines de liaison SUMO et des ubiquitine ligases (Miteva et al., 2010).

Ces SIM ont plusieurs mécanismes d'action (Figure 26) :

- Ils permettent les interactions non covalentes entre un isoforme SUMO et une protéine spécifique, ce qui peut induire un changement d'activité de la protéine cible ou une modification de sa localisation (Figure 26a).

- L'ubiquitine E3 ligase ring-finger 4 (RNF4) possède des SIM et est recrutée dans des protéines multi-SUMOylées. Elle les ubiquitine ensuite pour entraîner leur dégradation par le protéasome (Figure 26b).
- Les protéines contenant un SIM peuvent être recrutées et immobilisées sur des protéines SUMOylées, ce qui peut conduire à leur SUMOylation covalente en raison de la proximité des SUMO ligases (Figure 26c en haut). Les SIM de protéines peuvent faciliter le recrutement de UBC9 chargé d'un SUMO au niveau de la protéine, entraînant une SUMOylation covalente d'un résidu Lys à proximité (Figure 26c en bas). Une combinaison des deux mécanismes peut conduire à des amas de protéines SUMOylées.

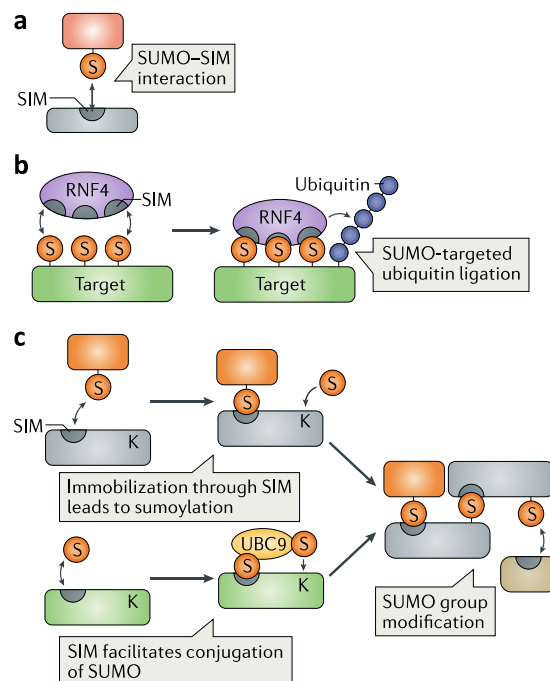


Figure 26 : Mécanismes de fonctionnement des SIM (Hendriks and Vertegaal, 2016)

Enfin, la présence de ces SIM peut être associée à la modification préférentielle d'un substrat pour un isoforme SUMO donné. Par exemple, la protéase 25 spécifique de l'ubiquitine (USP25) contient un SIM qui contribue à la modification préférentielle de cette protéine par SUMO2/3. De même, on retrouve deux SIM dans le domaine E3 ligase de RanBP2/Nup358 nommés IR1 et IR2. Le SIM IR1 permet des interactions non covalentes spécifiquement avec SUMO1 (pour revue (Gareau and Lima, 2010)).

5.3. Les protéines SUMO et la formation de chaines SUMO

5.3.1. Les isoformes SUMO

La SUMOylation peut modifier les protéines de tous les eucaryotes, ils expriment tous au moins un membre de la famille des protéines SUMO. La plupart des mammifères expriment trois protéines SUMO alors que *Arabidopsis thaliana* en expriment huit (Miura et al., 2007). Les eucaryotes «inférieurs» n'expriment qu'un isoforme SUMO. Pour les humains, 5 isoformes SUMO ont été identifiés à ce jour (Mattoscio et al., 2019). L'étude de la structure 3D des protéines SUMO a montré une forte identité avec les ubiquitines. En revanche, la séquence en acides aminés entre ces deux familles de protéines diffère de plus de 80% (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007).

L'isoforme SUMO1 est une protéine de 101 aa presque toujours retrouvée sous forme conjuguée, la quantité de SUMO1 libre est très limitée. Elle a une affinité particulière pour certains substrats spécifiques comme par exemple RanGAP1. (Shen et al., 1996).

Les protéines SUMO2 (95aa) et SUMO3 (103aa) sont très proches au niveau de leurs séquences (97%). Seuls quelques acides aminés situés en N-terminal diffèrent dans leur séquence respective. Lorsqu'on compare la séquence de SUMO1 avec SUMO2/3, on ne retrouve que 45% d'homologie mais leur structure 3D reste très proche. À l'inverse de SUMO1, elles sont principalement retrouvées sous forme non conjuguée et en quantité abondante. SUMO2/3 sont souvent associées à la poly-SUMOylation (chaines de protéines SUMO) et SUMO1 termine généralement ces chaines afin d'empêcher l'ajout supplémentaire d'isoformes SUMO (Lapenta et al., 1997; Mannen et al., 1996). L'abondance des SUMO2/3 permet une mobilisation rapide et massive de celles-ci en réponse à un stress cellulaire ou autres stimuli (Saitoh and Hinchey, 2000).

L'isoforme SUMO4 n'est pas exprimé dans tous les tissus. Il est principalement retrouvé dans les ganglions lymphatiques, la rate, les reins et le placenta. Il ne semble

pas conjugué dans des conditions normales, non pathologiques puisqu'il a été retrouvé en association avec le diabète (Wang et al., 2006).

Enfin, la protéine SUMO5 (84aa) identifiée plus récemment en 2016 par Liang et al, est exprimée principalement dans les testicules mais aussi dans le placenta, les poumons et le foie. Il a notamment été démontré que SUMO5 participe à la formation des PML-NB (Promyelocytic Leukaemia Nuclear Bodies), structures connues comme riches en protéines sumoylées (Liang et al., 2016).

Dans des conditions physiologiques, SUMO1 est constitutivement conjugué à des substrats, tandis que tous les autres paralogues SUMO sont préférentiellement conjugués en réponse au stress (Liang et al., 2016; Saitoh and Hinchey, 2000; Wei et al., 2008)

5.3.2. Les modifications post-traductionnelles des protéines SUMO

La SUMOylation est donc une modification post-traductionnelle permettant de réguler différents mécanismes cellulaires par ajout de protéines SUMO sur les lysines de protéines cibles. De même, ces protéines SUMO sont elles aussi la cible de modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination (Figure 27).

- SUMO1 peut être phosphorylée aux sérines 2, 9 et 32, ainsi qu'aux thréonines 10 et 76 ; acétylée aux lysines 23 et 37 ; et ubiquitinée aux lysines 7, 17, 23, 25, 37, 39, 48 et 78.
- SUMO2 peut être phosphorylée aux sérines 2, 27 et 53, et aux thréonines 12 et 37; acétylée aux lysines 11, 32, 41 et 44 ; et ubiquitinée aux lysines 7, 11, 20, 32, 34, 41 et 44.
- SUMO3 peut être phosphorylée aux sérines 28 et 54 et aux thréonines 12 et 38; acétylée aux lysines 11, 33, 42 et 45 et ubiquitinée aux lysines 7, 11, 21, 33, 35, 42 et 45 (pour revue (Hendriks and Vertegaal, 2016)).

L'acétylation qui est une modification post-traductionnelle ciblant les lysines des protéines peut ainsi entrer en compétition avec la SUMOylation qui elle-même cible les lysines. De ce fait, certains mécanismes induits par la SUMOylation de protéines sont régulés par l'acétylation (Ullmann et al., 2012).

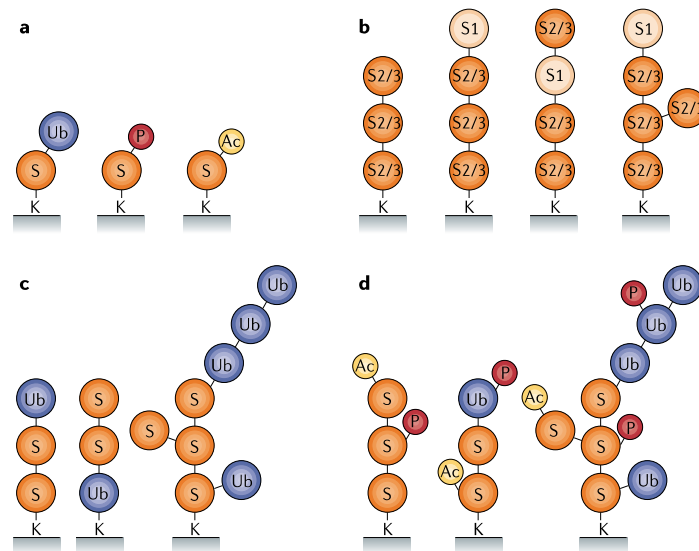


Figure 27 : La modification des protéines SUMO par d'autres modifications post-traductionnelles.

a. Les protéines SUMO (S) peuvent être la cible de plusieurs modifications post-traductionnelles, l'ubiquitination (Ub), la phosphorylation (P) et l'acétylation (Ac). **b.** SUMO2 et SUMO3 (S2/3) forment des chaînes qui peuvent inclure SUMO1 (S1). SUMO1 contient un site de SUMOylation inversé, également utilisé pour la formation de chaînes. De plus, les chaînes SUMO peuvent être ramifiées. **c.** Les SUMO peuvent former des chaînes mixtes avec l'ubiquitine par ubiquitination de SUMO et SUMOylation de l'ubiquitine. **d.** Les chaînes SUMO et les chaînes mixtes SUMO-ubiquitine peuvent être modifiées par phosphorylation et acétylation, augmentant encore la complexité de la signalisation (Hendriks and Vertegaal, 2016).

5.4. Les chaînes SUMO, l'ubiquitination et la dégradation protéasomale

5.4.1. Les chaînes SUMO

Comme pour les ubiquitines, les isoformes SUMO ont la capacité de former des chaînes de protéines SUMO (Figure 27b). Jusqu'à récemment, seules SUMO2/3 étaient décrites comme pouvant former des chaînes SUMO. Elles possèdent toutes les deux un motif consensus SUMO qui permet la formation de ces chaînes au niveau de leur lysine 11 (Tatham et al., 2001). SUMO1 semblait uniquement participer à ces chaînes comme une sorte de terminateur empêchant l'ajout d'autres SUMO2 ou 3

(Matic et al., 2008). Mais de récentes études ont démontré la présence d'un motif de SUMOylation inversé dans SUMO1 au niveau de sa lysine 7 favorisant la formation de chaînes SUMO. De plus, deux nouvelles lysines cibles pour la formation de chaînes ont été identifiées pour SUMO2/3, K21 et K33.

La poly-SUMOylation (chaînes) ainsi que la multi-SUMOylation (SUMOylation sur différentes lysines) peuvent être reconnues par certaines ligases E3 spécifiques appelées STUbL (SUMO-targeted ubiquitin E3 ligases).

5.4.2. Les STUbL et RNF4

Les protéines SUMOylées peuvent être ciblées par des ligases d'ubiquitine spécifiques à SUMO (STUbL). Elles sont un sous-ensemble d'ubiquitine E3 ligases qui reconnaissent spécifiquement les protéines SUMOylées pour y déposer une marque d'ubiquitination (Gareau and Lima, 2010). Ainsi, des expériences ont démontré que la surexpression de SUMO2 induit la formation de protéines poly-SUMOylées et que celles-ci sont également ubiquitinées (Schimmel et al., 2008). De nombreuses STUbL ont été identifiées chez les eucaryotes inférieurs. Chez l'homme, deux STUbL ont été identifiées à ce jour, la principale RNF4 (ubiquitin–protein ligase ring-finger 4) et RNF111.

RNF4 est une protéine de 190 aa possédant 4 SIM et un domaine RING. Des études ont démontré que ses SIM 2 et 3 se lient aux chaînes poly-SUMO2 alors que les deux autres SIM semblent avoir un rôle mineur (Kumar and Sabapathy, 2019). Ses domaines SIM permettent la reconnaissance des protéines SUMOylées alors que son domaine RING permet de catalyser l'ubiquitination des protéines modifiées par SUMO (Figure 28). Ainsi RNF4 lie la SUMOylation et l'ubiquitination. Une étude a démontré que RNF4 s'associe faiblement avec les protéines modifiées par un seul SUMO2 ou par un SUMO2 dimérique. En revanche, il s'associe fortement avec les chaînes poly-SUMO2 (Tatham et al., 2008). RNF4 est important dans le maintien de la stabilité du génome, en régulant les composants de réponse aux dommages de l'ADN tels que MDC1, BRCA1, PARP1 et JARID1B/KDM5B (Galanty et al., 2012; Hendriks et al., 2015; Vyas et al., 2013). De plus, les modifications par RNF4 peuvent altérer la localisation subcellulaire et la dynamique fonctionnelle des substrats cibles (Fryrear et

al., 2012). Enfin RNF4 permet comme indiqué précédemment le marquage des protéines pour leur dégradation protéasomale (Tatham et al., 2008).

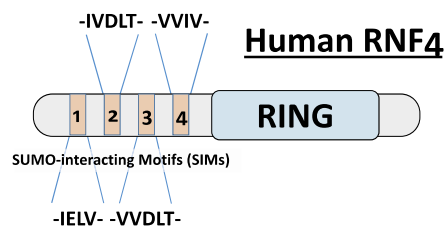


Figure 28 : Domaines qui composent RNF4 (Staudinger, 2017)

5.4.3. La SUMOylation comme signal pour la dégradation des protéines par la voie du protéasome

Contrairement aux premières études qui indiquaient que la SUMOylation et l'ubiquitination étaient deux modifications post-traductionnelles antagonistes puisqu'elles ciblent les mêmes lysines, il apparaît que ces deux voies peuvent être connectées par des STUbL (Figure 26, 27, 28). Des études ont démontré qu'un quart des lysines ciblées par la SUMOylation peuvent également être la cible de l'ubiquitination (Geoffroy and Hay, 2009).

L'un des exemples les plus connus opposant la SUMOylation à l'ubiquitination est l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B α . Ainsi, I κ B α peut être ubiquitiné, ce qui induit sa dégradation par la voie du protéasome et libère NF- κ B. Cependant, I κ B α peut également être SUMOylé sur la même lysine, ce qui empêche sa dégradation, renforce son action inhibitrice et empêche la transcription dépendante de NF- κ B (Miteva et al., 2010).

Plusieurs études ont ensuite démontré le lien entre la poly-SUMOylation, RNF4, l'ubiquitination et la dégradation protéasomale. Des expériences de déplétion de RNF4 par siRNA ont induit l'accumulation de conjugués SUMO de haut poids moléculaire, RNF4 est donc impliqué dans la dégradation de ces protéines poly-SUMOylées (Tatham et al., 2008). De plus, le traitement avec des inhibiteurs du protéasome induit également l'accumulation de conjugués SUMO de haut poids moléculaire (Bailey and O'Hare, 2005). Ainsi, la poly-SUMOylation sert de signal au recrutement de RNF4 sur les protéines poly-SUMOylées afin d'induire leur ubiquitination et enfin leur dégradation par le protéasome (pour revue (Geoffroy and Hay, 2009). De plus en plus

d'études décrivent et mettent en lumière de nouvelles protéines cibles de cette voie d'ubiquitination SUMO-dépendante et de la dégradation par la voie du protéasome (Cheng et al., 2007; Sun et al., 2020; Swift et al., 2021; Tatham et al., 2008).

5.5. Les effets de la SUMOylation

Il est très difficile de prédire les conséquences de la SUMOylation sur les protéines contrairement à d'autres modifications post-traductionnelles comme l'acétylation. La SUMOylation permet, comme décrit précédemment, la régulation de nombreux processus nucléaires. Ainsi, dans leur revue sur l'effet de la SUMOylation sur la transcription, Rosonina E. *et al.*, annoncent que plus de 300 facteurs de transcription activateurs ou répresseurs de la transcription par l'ARN Pol II sont SUMOylés (Rosonina et al., 2017). Les nombreuses études sur la SUMOylation et son effet sur la transcription ont identifié que celle-ci a généralement un effet répresseur malgré certaines exceptions notables. La modulation de la transcription par la SUMOylation se fait principalement par deux mécanismes :

- (1) le recrutement de complexes répresseurs au niveau des promoteurs des gènes
- (2) la compétition et l'interférence avec d'autres PTM qui ciblent soit les mêmes lysines que la SUMOylation soit un résidu proche du site de SUMOylation telles que l'acétylation ou la phosphorylation (pour revue (Rosonina et al., 2017)).

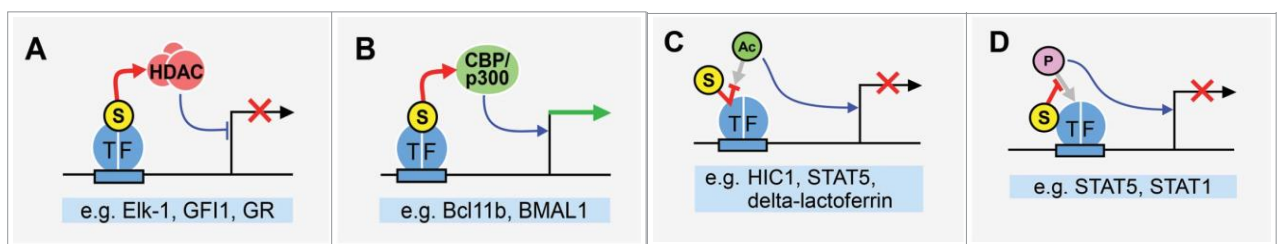


Figure 29 : Modulation de l'activité des facteurs de transcription par la SUMOylation (Rosonina et al., 2017).

5.5.1. La modulation des complexes répresseurs ou activateurs de la transcription par la SUMOylation

La principale conséquence de la SUMOylation des facteurs de transcription est la modification des niveaux de FT associés à la chromatine de façon directe en impactant la capacité du FT à se lier à l'ADN ou de façon indirecte en régulant l'abondance mais aussi la localisation du FT (Rosonina et al., 2017). L'exemple le plus connu de l'effet répresseur que peut avoir la SUMOylation sur la transcription est le cas de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B α présenté ci-dessus. Mais d'autres protéines SUMOylées peuvent induire par exemple le recrutement de HDACs et ainsi réduire l'efficacité de transcription (Figure 29a).

Par exemple, le facteur Elk-1 est SUMOylé au niveau de son domaine ETS, ce qui induit le recrutement de HDAC2, une diminution de l'acétylation des histones et finalement une répression transcriptionnelle au niveau des gènes cibles de Elk-1. Cette modification peut être inversée par l'activation de la voie ERK MAP kinase (Yang and Sharrocks, 2004).

Une autre étude sur le récepteur des glucocorticoïdes a démontré l'effet répresseur de la SUMOylation. La modification par un isoforme SUMO de la lysine 293 présente dans une séquence conservée en Nter du récepteur permet la formation d'un complexe répresseur SUMO-NCoR1/SMRT-HDAC3. Une forme non SUMOylée du récepteur nucléaire est incapable de recruter le complexe répresseur NCoR1/SMRT-HDAC sur les gènes cibles normalement réprimés (Hua et al., 2016).

Le répresseur transcriptionnel GFI1 (growth factor independence 1) est également SUMOylé sur sa lysine 239 ce qui permet le recrutement du complexe LSD1/CoREST et la répression de MYC. Mais une forme déficiente en SUMOylation de ce facteur ne s'associe pas efficacement avec les composants du CoREST/HDAC et ne parvient pas à réprimer correctement la transcription. Cette étude démontre que la SUMOylation de GFI1 favorise le recrutement de LSD1/CoREST et donc la répression de MYC pour réguler la différenciation hématopoïétique (Andrade et al., 2016).

Enfin, le répresseur transcriptionnel KAP1 peut être SUMOylé au niveau de plusieurs lysines, K554, K779 et K804. Il peut être modifié par SUMO1 et le statut de SUMOylation de celui-ci est corrélé avec sa capacité de répression. Lorsque KAP1 est SUMOylé, il diminue l'acétylation de H3K9 et H3K14 et augmente la méthylation de H3K9 au niveau du promoteur p21 (Lee et al., 2007).

Cependant, certaines études ont tout de même montré un rôle activateur de la transcription par la SUMOylation (Figure 29B). Par exemple, CTIP2 peut être SUMOylé sur sa lysine 679. Celle-ci entraîne le recrutement du co-activateur transcriptionnel p300 sur les promoteurs réprimés par CTIP2 et induit donc la transcription de gènes nécessaires au développement des lymphocytes T (Zhang et al., 2012).

5.5.2. La compétition entre l'acétylation ou la phosphorylation avec la SUMOylation

En plus des effets décrits dans la partie précédente, la SUMOylation peut aussi entrer en compétition avec d'autres PTM comme l'acétylation et la phosphorylation. Elle influence ainsi également l'activité des facteurs de transcription touchés par ces PTM.

L'acétylation s'effectue également sur les lysines des protéines cibles, il y a donc une compétition directe entre ces deux PTM (Figure 29C). Ainsi, selon l'état de la cellule, une même protéine peut être soit acétylée soit SUMOylée sur une même lysine. Par exemple, l'acétylation de HIC1 ne permet plus son interaction avec MTA1, un composant du complexe répresseur NuRD. Mais la SUMOylation sur la même lysine rétablit l'interaction entre HIC1 et MTA1 et donc l'activité répressive de HIC1 (Van Rechem et al., 2010).

La phosphorylation peut aussi entrer en compétition avec la SUMOylation même si ces deux PTM ne ciblent pas les mêmes acides aminés (Figure 29D). Par exemple, le facteur STAT5 peut être SUMOylé sur deux lysines proches : K696 et K700. La SUMOylation de ces deux lysines inhibe la phosphorylation de Y694 et entre en compétition avec la possible acétylation de K696. L'acétylation et la phosphorylation de STAT5 favorisent la transcription de gènes impliqués dans le développement et dans différentes fonctions des cellules immunitaires (Van Nguyen et al., 2012). De même, STAT1 phosphorylé sur Y701 active la transcription des gènes régulés par ce facteur de transcription. La SUMOylation de K703 empêche cette phosphorylation activatrice (Droescher et al., 2017).

5.5.3. La modulation de l'association des facteurs de transcription à l'ADN par la SUMOylation

En plus de réguler l'activité des FT via des interactions avec différents complexes et d'autres PTM, la SUMOylation peut aussi contrôler l'association des FT avec leurs sites de fixation sur la chromatine. Dans la plupart des études, la SUMOylation réduit l'association des FT avec la chromatine et ce par différents mécanismes. Il peut y avoir une action directe de la SUMOylation sur la capacité du FT à se lier à l'ADN. La réduction de la présence des FT par la SUMOylation peut aussi être indirecte en contrôlant la quantité de FT au niveau des promoteurs ou encore en influençant la distribution subcellulaire des FT. Cependant, certains FT font exception à cette généralité, notamment GATA1 ou Prox1. Pour ce dernier, la lysine 556 est le principal site de SUMOylation de Prox1 et la mutation de ce site (K556R) réduit la liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle de Prox1 (Pan et al., 2009).

Certains FT sont principalement SUMOylés lorsqu'ils sont déjà associés à l'ADN et pendant la transcription active des gènes cibles. Cette modification favorise leur clairance de l'ADN et limite ainsi l'expression des gènes. C'est le cas par exemple de c-Fos qui est SUMOylé lorsqu'il est fixé à l'ADN. Une étude a démontré que le blocage de la SUMOylation de c-Fos stimule l'activité du promoteur et induit aussi une augmentation des niveaux de c-Fos au niveau du promoteur. Ces résultats suggèrent ainsi que la SUMOylation de ce FT régule sa présence sur le promoteur (Tempé et al., 2014). Ce mécanisme contrôlerait l'expression des gènes une fois la transcription initiée et expliquerait la présence d'une marque principalement répressive au niveau de gènes actifs.

Un autre mécanisme décrit comme pouvant impacter l'association des FT à la chromatine est la régulation de la stabilité des FT par la SUMOylation. Comme décrit précédemment, la SUMOylation peut interagir avec l'ubiquitination afin de diriger leurs cibles communes vers une dégradation protéasomale. Ce mécanisme permet donc de réguler les niveaux de FT et le nombre de FT capables de se lier aux promoteurs. Plusieurs facteurs de transcription ont été décrits comme SUMOylés puis ciblés par les STUbL afin de les dégrader notamment Sp1 ou c-Myc (González-Prieto et al., 2015; Wang et al., 2016).

Il est classiquement décrit que l'un des effets de la SUMOylation est de modifier la localisation cellulaire de sa cible. C'est également le cas pour certains facteurs de transcription, ce qui a un effet sur la transcription de leurs gènes cibles. Par exemple, la SUMOylation d'un FT présent à un instant précis dans le noyau pour initier la transcription d'un de ces gènes cibles peut induire sa relocalisation dans le cytoplasme et ainsi empêcher une transcription efficace. C'est en effet le cas du facteur FoxM1b, une étude a démontré que sa SUMOylation favorise sa translocation cytosolique. De plus, la modification SUMO de FoxM1b facilite sa dégradation protéasomale (Zhang et al., 2015).

5.5.4. La SUMOylation, les histones et la chromatine

La structure de la chromatine et donc l'expression des gènes est contrôlée de façon dynamique par différentes modifications post-traductionnelles qui peuvent cibler les histones. En plus des PTM classiquement décrites, les histones peuvent également être la cible de la SUMOylation. Celle-ci s'effectue comme la plupart des autres PTM au niveau de la queue des histones. Les études ont initialement démontré la SUMOylation des histones 4 (H4) mais les autres histones peuvent également être SUMOylés. La conjugaison d'un isoforme SUMO sur H4 augmente son interaction avec HDAC1 et avec HP1 γ (hétérochromatine protéine 1), suggérant initialement un rôle répressif de la SUMOylation des histones (Shiio and Eisenman, 2003).

Il a été démontré que la SUMOylation des histones peut moduler et interagir avec d'autres PTM. Lors du passage d'une transcription active à une transcription réprimée, l'acétylation des histones médiée par la p300 une HAT favorise la SUMOylation des histones. Ainsi, une fois SUMOylés, les histones recrutent HDAC6 et HP1, qui contribuent à la compaction de la chromatine. Cependant, il n'est pas encore clair si la SUMOylation des histones stimule la méthylation de H3K9, un marqueur de la liaison à HP1 (Figure 30A) (Girdwood et al., 2003).

D'autres études notamment sur les levures *S. cerevisiae* ont clairement établi que la SUMOylation régule directement la dynamique de la chromatine et que cette modification est classiquement répressive notamment par compétition ou inhibition de marques épigénétiques activatrices (Nathan et al., 2006). La SUMOylation des histones chez la levure interfère avec l'acétylation des histones par les HATs ou avec

l'ubiquitination de H2BK123 par Rad6 et Bre1, inhibant ainsi la transcription (Figure 30B) (pour revue (Ryu and Hochstrasser, 2021)).

Le groupe de Champak Chatterjee a activement étudié les mécanismes de SUMOylation de l'histone 4. Dans une première étude, ils ont démontré que la SUMOylation de H4 (suH4) empêche la compaction de la chromatine en atténuant les interactions entre les nucléosomes (Dhall et al., 2014). Cette découverte est cependant en contradiction avec les premières études sur la SUMOylation des histones qui avaient mis en évidence la répression des gènes par suH4 comme indiqué précédemment. Mais dans une deuxième étude, ce même groupe a démontré que suH4 stimule aussi l'élimination de la marque activatrice H3K4me des histones par LSD1 associé avec CoREST et HDAC1. Ce mécanisme s'effectue grâce au motif SIM présent dans CoREST qui permet une interaction avec le suH4. Ainsi, la SUMOylation de H4 pourrait servir de plateforme de recrutement au complexe LSD1/CoREST/HDAC1. Puis ce complexe induit la répression des gènes par suppression des marques épigénétiques activatrices présentes comme la méthylation H3K4 et l'acétylation (Figure 30C). Ensuite, SUMO3 est retiré de l'histone 4 pour faciliter la formation d'hétérochromatine transcriptionnellement silencieuse (Dhall et al., 2017).

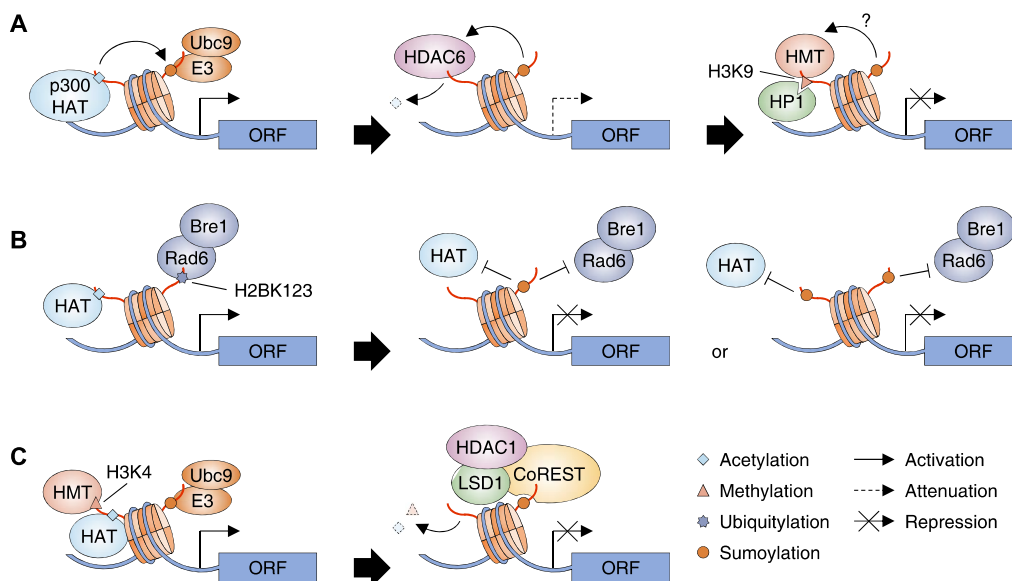


Figure 30 : Mécanismes de répression de la transcription par la SUMOylation des histones (Ryu and Hochstrasser, 2021).

5.6. La SUMOylation et le VIH

De nombreuses études se sont penchées sur les mécanismes de SUMOylation lors de l'infection virale et sur leurs effets. Les protéines virales peuvent être SUMOylées mais la machinerie cellulaire de la SUMOylation peut également être manipulée par les virus afin d'induire la SUMOylation de certaines protéines cellulaires impliquées notamment dans la réponse immunitaire antivirale. La réponse immunitaire innée est la première ligne de défense de l'organisme. Lors d'une infection virale la reconnaissance de certains composants du virus par les PRR composés des récepteurs cellulaires membranaires (Toll-like receptors) ou cytoplasmiques (RIG-I-like helicases) induit la synthèse d'IFN dans les cellules infectées, l'activation de la voie Jak/STAT et des ISG (interferon-stimulated genes). Ce mécanisme induit l'expression de protéines possédant une activité antivirale ou immunomodulatrice. La SUMOylation pourrait jouer un rôle dans la régulation de la réponse antivirale notamment en modulant la synthèse d'IFN (Kim and Ahn, 2015; Liu et al., 2013a, 2013b). De plus, certains virus codent pour des protéines qui miment l'action des STUBs, cela permet ainsi la dégradation de protéines SUMOylées (Boutell et al., 2011). D'autres virus arrivent à moduler les niveaux globaux de SUMOylation dans les cellules qu'ils infectent. La protéine BGLF4 du Virus d'Epstein-Barr a la capacité de baisser les niveaux de SUMOylation (Li et al., 2012b). Inversement, l'infection par le virus de la grippe de type A (IAV) augmente significativement la SUMOylation à la fois par SUMO1 et SUMO2/3 (Domingues et al., 2015).

Pour le VIH-1, plusieurs des protéines virales ainsi que les facteurs cellulaires associés au VIH-1 peuvent être SUMOylés avec des effets qui diffèrent sur la réplication virale.

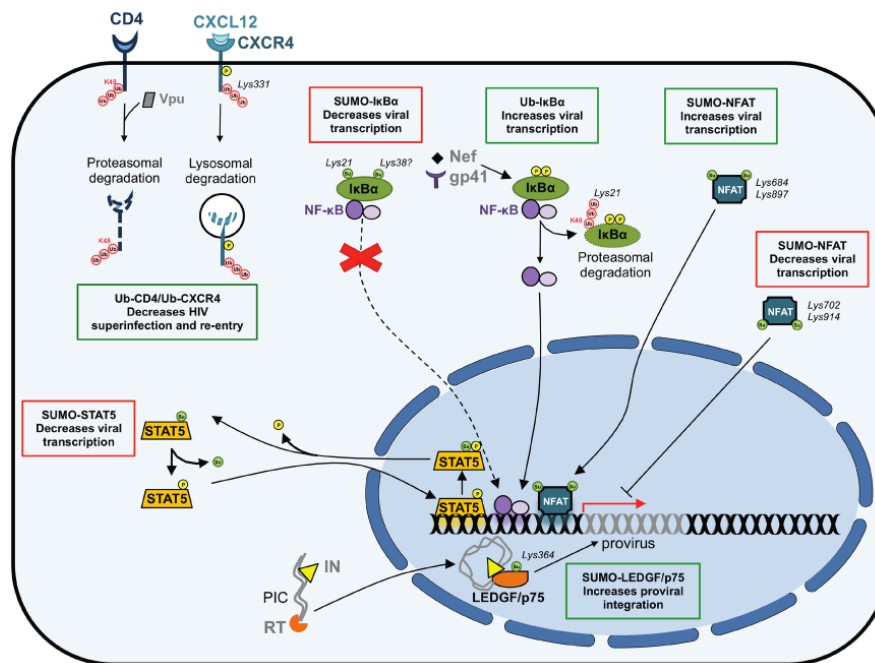


Figure 31 : Effets de la SUMOylation sur les facteurs cellulaires impliqués dans la réplication du VIH (Colomer-Lluch et al., 2019).

La protéine p6 provient de la polyprotéine Gag du VIH-1, elle est constituée des 52 derniers aa en Cter de Gag. Elle a un rôle dans l'incorporation de Vpr dans la PV ainsi que dans le bourgeonnement des virions. Il a été démontré que p6 est SUMOylé sur sa lysine 27 par l'isoforme SUMO1. Deux domaines de p6 interagissent avec les protéines Tsg101 et ALIX appartenant à la machinerie ESCRT qui joue un rôle dans le relargage des virions néosynthétisés. De plus, l'ubiquitination de p6 renforce son interaction avec ESCRT (Patnaik et al., 2000). Or la SUMOylation et la monoubiquitination de p6 s'effectuent sur la même lysine et entrent donc en compétition. La SUMOylation de p6 peut empêcher l'ubiquitination et donc limiter indirectement le relargage efficace des virions (pour revue (Colomer-Lluch et al., 2019)). De plus, cette étude a démontré que la SUMOylation de p6 induit une réduction de l'infectiosité des virions (Gurer et al., 2005).

L'intégrase (IN) est une enzyme virale dont l'objectif est d'intégrer l'ADN viral double brin dans le génome de la cellule hôte infectée. Elle participe également à d'autres étapes de la réplication du VIH-1 comme la transcription inverse ou encore import nucléaire du PIC. L'intégrase est la cible de plusieurs PTM dont l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la SUMOylation qui permettent de réguler son activité. Par exemple, son ubiquitination induit sa dégradation par le protéasome. L'intégrase peut être SUMOylée sur 3 de ses lysines : K46, K136 et K244. Ainsi, la

mutation des résidus accepteurs SUMO dans l'intégrase réduit l'infectiosité et ralentit la réplication des virus mutés. De plus, les cellules infectées par des virus avec une IN mutée sur ses lysines SUMOylées présentent une diminution significative des événements d'intégration par rapport aux virus non mutés. La SUMOylation semble donc réguler l'affinité de l'intégrase avec différents facteurs qui participent à la réplication du VIH. Enfin, l'intégrase possède des SIM qui permettent son interaction avec des facteurs cellulaires ou viraux SUMOylés dont LEDGF/p75 ou p300 (pour revue (Colomer-Lluch et al., 2019)).

En plus des protéines virales, la SUMOylation peut également cibler les facteurs cellulaires qui participent et régulent la réplication du VIH-1.

Comme décrit précédemment, LEDGF/p75 est associé à l'étape d'intégration du génome viral. LEDGF/p75 interagit directement avec la protéine virale IN via un domaine de liaison situé en Cter. Cette interaction permet l'association du PIC et favorise à terme l'intégration du provirus VIH dans le génome de l'hôte (Engelman and Cherepanov, 2008; Llano et al., 2006; Shun et al., 2007). LEDGF/p75 est SUMOylé sur plusieurs lysines dont la lysine 364 en Cter. Celle-ci diminue sa stabilité mais augmente significativement l'efficacité d'intégration de l'ADN proviral (Bueno et al., 2010; Colomer-Lluch et al., 2019)

Les facteurs de transcription se lient sur le promoteur du virus intégré et permettent l'expression de l'ADN viral. Ainsi, le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle essentiel dans l'expression des gènes du VIH-1. Comme décrit précédemment, dans des conditions normales, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par son inhibiteur I κ B α . Mais si nécessaire, I κ B α peut être dégradé par le protéasome par une cascade de phosphorylation et d'ubiquitination permettant finalement la translocation de NF- κ B dans le noyau. En revanche, la SUMOylation de I κ B α sur sa lysine 21 (Desterro et al., 1998) empêche son ubiquitination et renforce donc son activité inhibitrice sur NF- κ B empêchant au final l'expression des gènes (Colomer-Lluch and Serra-Moreno, 2017). Mais le virus peut contrecarrer cet effet par ses protéines virales Nef et gp41 qui facilitent l'ubiquitination d'I κ B α et donc la libération nucléaire de NF- κ B pour favoriser l'expression du VIH-1 (Postler and Desrosiers, 2013; Sauter et al., 2015).

Le facteur de transcription NFAT spécifique aux lymphocytes est SUMOylé sur plusieurs de ces lysines. La SUMOylation de K684 est requise pour l'activité

transcriptionnelle de NFAT1 (Terui et al., 2004) alors que la modification par un isoforme SUMO de ses lysines 702 et 914 favorise l'interaction de NFAT avec des HDACs, ce qui induit la formation d'hétérochromatine (Nayak et al., 2009).

Enfin, le facteur de transcription STAT5 permet lui aussi la transcription des gènes viraux et est lui aussi touché par la SUMOylation. Pour être actif, STAT5 est phosphorylé dans le cytoplasme afin d'être transporté dans le noyau et de jouer son rôle d'activation de la transcription. Mais, sa SUMOylation le redirige vers le cytoplasme et supprime son état de phosphorylation. Par conséquent, la SUMOylation de STAT5 inhibe la transcription du VIH et peut favoriser la latence virale (Bosque et al., 2017).

Les facteurs de restriction sont des protéines cellulaires généralement induites par la stimulation par l'interféron. Ils bloquent des étapes spécifiques du cycle de réplication des virus et agissent contre l'infection virale. Comme toutes les autres protéines, l'activité des facteurs de restriction peut être modulée par les PTM.

TRIM5 α (Tripartite motif 5- α) se lie à la capside virale et favorise sa dégradation prématurée en recrutant la machinerie protéasomale. TRIM5 α peut être SUMOylé sur la lysine 10 mais cette modification directe ne semble pas affecter son activité antivirale. En revanche, 3 motifs SIM ont été identifiés dans TRIM5 α et leur mutation abolit son activité antivirale. Cette étude prouve l'implication de la machinerie de SUMOylation dans le rôle de TRIM5 α et plus particulièrement l'importance des interactions non covalentes via les SIM (Dutrieux et al., 2015). De plus, la SUMOylation de TRIM5 α régule son activité ligase E3 et diminue notamment son activité d'auto-ubiquitination, ce qui facilite l'activation de NF- κ B et AP-1, déclenchant par conséquent une réponse immunitaire innée (pour revue (Colomer-Lluch et al., 2019))(Dutrieux et al., 2015; Nepveu-Traversy and Berthoux, 2014)

SAMHD1 est une enzyme cellulaire qui inhibe l'étape de transcription inverse du VIH-1 principalement en limitant le nombre de dNTP dans les cellules infectées non cycliques. La phosphorylation T592 de SAMHD1 régule négativement son activité antivirale, mais pas sa fonction dNTPase. Ces données remettent en question l'établissement d'un état antiviral médié par SAMHD1 qui repose uniquement sur l'épuisement des dNTP et sur l'état de phosphorylation de la thréonine 592. Une étude récente a démontré la SUMOylation de SAMHD1 sur sa lysine K595 via un motif SIM. La suppression de la SUMOylation inhibe l'activité de restriction mais pas l'activité

dNTPase et ceci même lorsque T592 est déphosphorylé et donc que l'activité antivirale devrait être active. De plus, la fusion artificielle de l'isoforme SUMO2 à un variant SAMHD1 inactif restaure sa fonction antivirale. Cette étude établit clairement que l'absence de phosphorylation de T592 ne suffit pas à expliquer l'activité de restriction de SAMHD1. La SUMOylation de K595 est nécessaire pour stimuler une activité antivirale indépendante de la dNTPase dans les cellules immunitaires non cycliques, effet inhibé par la phosphorylation dépendante de la cycline/CDK de T592 dans les cellules cyclables (Martinat et al., 2021).

6. Objectifs de thèse

Le traitement de l'infection par VIH-1 avec les antirétroviraux est efficace puisqu'il fait chuter la virémie des patients sous les limites de détection des techniques de diagnostic classiques. En revanche, dès lors que le traitement est interrompu, la charge virale augmente et le virus est à nouveau détectable. Il n'est donc pas éliminé par le traitement antirétroviral. Il a été démontré que le VIH-1 persiste sous la forme de virus latents dans des cellules qu'on appelle réservoirs. Ces cellules latentes sont un frein à l'éradication du VIH de l'organisme et donc à la guérison ou la rémission des patients (Davey et al., 1999; García et al., 1999; Mata et al., 2005). La compréhension fine des mécanismes qui régissent cette latence permettrait d'envisager de nouveaux traitements qui auraient pour but d'éliminer ces réservoirs ou au minimum de réduire leur taille. Un important réservoir de cellules infectées latentes se trouve dans le système nerveux central avec les cellules microgliales (Churchill et al., 2006; Cosenza et al., 2002; Joseph et al., 2015). L'étude des mécanismes moléculaires de la latence virale dans ces cellules a mis en lumière le rôle clé du facteur de transcription cellulaire CTIP2 (Cherrier et al., 2013; Marban et al., 2005, 2007). Récemment, un projet de recherche de notre laboratoire sur le facteur de transcription cellulaire KAP1, a permis de démontrer que CTIP2 et KAP1 coopèrent dans l'inhibition de l'expression des gènes du VIH-1. De plus cette étude a mis en lumière un lien entre la latence virale dans les cellules microgliales, KAP1 et la machinerie de SUMOylation (Ait-Ammar et al., 2021). Mon projet de thèse principal s'attache donc à étudier le rôle de la SUMOylation dans la latence du VIH-1 dans les cellules microgliales.

Notre laboratoire fait partie du consortium européen EU4HIVCURE qui travaille sur les stratégies de guérison des patients infectés par le VIH-1. Cela m'a permis de réaliser un deuxième projet en collaboration avec le laboratoire CEPHR de l'University College Dublin et le Mater Misericordiae University Hospital. Le but a été de développer une technique de quantification de CTIP2 dans le plasma de patients infectés et de déterminer s'il y a une corrélation entre la latence virale et les niveaux détectés de CTIP2. Ce projet est encore en cours et nécessite une analyse statistique poussée, les résultats ne sont donc pas assez aboutis pour être présentés dans cette thèse.

Enfin, suite à la découverte du SARS-CoV-2 et à la pandémie actuelle, nous avons initié un nouveau projet au laboratoire, sur la détection du SARS-CoV-2 dans les eaux usées. Nous avons mis en place une procédure de quantification du SARS-CoV2 dans les eaux usées de 11 stations alsaciennes pour suivre l'évolution de l'épidémie et informer les autorités locales, régionales et nationales. Tous nos efforts se sont concentrés sur ce projet et j'y ai contribué pendant 9 mois, soit presque un tiers de la durée de ma thèse. J'ai participé de façon active à l'élaboration du protocole de quantification du virus et sa validation dans le cadre des Essais Inter Laboratoires (EIL). Il fait intervenir des techniques de biologie moléculaire classiques utilisées quotidiennement au laboratoire mais qu'il a fallu adapter à une matrice totalement différente, qui est celle des eaux usées. Ce projet a permis au laboratoire d'intégrer le réseau national «Obépine» de surveillance du SARS-CoV-2 dans les eaux usées. Il a également permis de lever des fonds afin de poursuivre ce nouvel axe de recherche. Ce protocole a aussi été utilisé pour certains résultats de la publication sur le SARS-CoV-2 en annexe, à laquelle j'ai participé.

Mon manuscrit de thèse sera avant tout orienté sur le VIH-1, principal sujet de mes recherches mais le protocole du projet Sars-CoV-2 est disponible en annexe.

Résultats

1. Publication n°1

HIV-1 Vpr mediates the depletion of the cellular repressor CTIP2 to counteract viral gene silencing

Forouzanfar F, Ali S, Wallet C, De Rovere M, Ducloy C, El Mekdad H, El Maassarani M, Aït-Ammar A, Van Assche J, Boutant E, Daouad F, Margottin-Goguet F, Moog C, Van Lint C, Schwartz C, Rohr O. HIV-1 Vpr mediates the depletion of the cellular repressor CTIP2 to counteract viral gene silencing.

Sci Rep. 2019 Sep 11;9(1):13154.

doi: 10.1038/s41598-019-48689-x. PMID: 31511615; PMCID: PMC6739472.

La latence post-intégrative du VIH-1 reste l'un des principaux freins à l'éradication du VIH-1 dans l'organisme. Les cellules microgliales sont le principal réservoir de cellules infectées latentes dans le système nerveux central. Le laboratoire a démontré l'importance du facteur cellulaire CTIP2 dans l'établissement et le maintien de cette latence dans ces cellules par recrutement de deux complexes. Le VIH-1 possède des protéines appelées «accessoires» dont certaines permettent au virus d'échapper au contrôle de l'infection par la réponse immunitaire. La protéine virale Vif cible APOBEC3G, Vpu cible la tetherine et Vpx cible SAMHD1. En revanche, aucun mécanisme clair n'avait pour l'instant été attribué à Vpr. Dans cette étude, le laboratoire a démontré l'existence d'un mécanisme viral d'échappement au contrôle de l'expression des gènes du VIH-1 par CTIP2. La production de Vpr induit la dégradation de CTIP2 par la voie du protéasome dans les cellules infectées. Cette dégradation fait intervenir le complexe Cul4A-DDB1-DCAF1 ubiquitin ligase. La dégradation de CTIP2 sur le promoteur du VIH-1 par Vpr a un impact positif sur la transcription virale puisque Vpr réduit la répression transcriptionnelle induite par CTIP2 en le dégradant. Ce mécanisme permet également de favoriser les fonctions de Tat, primordiales à l'expression des gènes du VIH-1.

Dans cette publication, j'ai participé au processus de révision.

OPEN

HIV-1 Vpr mediates the depletion of the cellular repressor CTIP2 to counteract viral gene silencing

F. Forouzanfar¹, S. Ali^{1,2}, C. Wallet¹, M. De Rovere¹, C. Ducloy³, H. El Mekdad¹, M. El Maassarani¹, A. Aït-Ammar^{1,8}, J. Van Assche¹, E. Boutant⁴, F. Daouad¹, F. Margottin-Goguet^{5,6,7}, C. Moog³, C. Van Lint⁸, C. Schwartz¹ & O. Rohr¹

Mammals have evolved many antiviral factors impacting different steps of the viral life cycle. Associated with chromatin-modifying enzymes, the cellular cofactor CTIP2 contributes to HIV-1 gene silencing in latently infected reservoirs that constitute the major block toward an HIV cure. We report, for the first time, that the virus has developed a strategy to overcome this major transcriptional block. Productive HIV-1 infection results in a Vpr-mediated depletion of CTIP2 in microglial cells and CD4+ T cells, two of the major viral reservoirs. Associated to the Cul4A-DDB1-DCAF1 ubiquitin ligase complex, Vpr promotes CTIP2 degradation via the proteasome pathway in the nuclei of target cells and notably at the latent HIV-1 promoter. Importantly, Vpr targets CTIP2 associated with heterochromatin-promoting enzymes dedicated to HIV-1 gene silencing. Thereby, Vpr reactivates HIV-1 expression in a microglial model of HIV-1 latency. Altogether our results suggest that HIV-1 Vpr mediates the depletion of the cellular repressor CTIP2 to counteract viral gene silencing.

Jawed vertebrates including mammals have developed innate and acquired immune responses to fight infections. Mammals have evolved many antiviral factors such as SAMHD1 or APOBEC3G that limit virus expression^{1–3}. We have reported that the cellular cofactor CTIP2 (Bcl11b) favors the establishment and the persistence of HIV-1 post-integration latency in microglial cells, the main target of the virus in the brain^{4–6}. CTIP2 works as a scaffold protein to recruit at least two different complexes in microglial cells. As part of a chromatin remodelling complex CTIP2 is associated with the lysine demethylase LSD1, the histone deacetylases HDAC1 and HDAC2, and the histone methyltransferase SUV39H1^{4,7–9}. In CD4+ T cells, CTIP2 associates with the NuRD chromatin remodelling complex¹⁰. In addition to this epigenetic silencing, CTIP2 contributes to control the elongation process of gene transcription. Indeed, we found CTIP2 associated with an inactive P-TEFb complex including HEXIM1, HMGA1 and the 7SK snRNA^{11,12}. As part of this new complex, CTIP2 represses P-TEFb functions and thereby contributes to limit the reactivation of latently integrated HIV-1 proviruses. Altogether, CTIP2 favors the establishment and the persistence of HIV-1 gene latency in microglial cells, the major reservoirs of virus in the central nervous system.

Lentiviruses such as SIV and HIV have developed several mechanisms to evade innate and adaptive immune responses. “Accessory” proteins (Nef, Vif, Vpu, Vpx) are encoded by these viruses to allow immune evasion. For example, Vpx is involved in the degradation of SAMHD1 via the proteasome pathway (reviewed in¹³). Proteasome-mediated degradation is a privileged pathway subverted by HIV-1 to counteract cellular defenses. Associated with a Cul4A-based ubiquitin ligase complex through DCAF1 (VprBP), the HIV-1 accessory protein Vpr has long been hypothesized to target an as-yet undiscovered host restriction factor for degradation in order to induce G2 arrest^{14,15}. Vpr has been proposed to promote the degradation of cellular factors including UNG2¹⁶, Dicer¹⁷, IRF3¹⁸, ZIP¹⁹, the HTLF DNA translocase²⁰ and the post-replication DNA repair factor Exo1²¹. By

¹Université de Strasbourg, EA7292, FMTS, IUT Louis Pasteur, Schiltigheim, France. ²Institute of Microbiology, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan. ³INSERM U1109, Fédération de Médecine Translationnelle (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France. ⁴Université de Strasbourg, UMR 7021 CNRS, Illkirch, France. ⁵INSERM, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014, Paris, France. ⁶CNRS, UMR8104, Paris, France. ⁷Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ⁸Université Libre de Bruxelles (ULB), Service of Molecular Virology, Department of Molecular Biology (DBM), Gosselies, Belgium. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.V.L. (email: cvlint@ulb-ac.be) or C.S. (email: christian.schwartz@unistra.fr) or O.R. (email: olivier.rohr@unistra.fr)

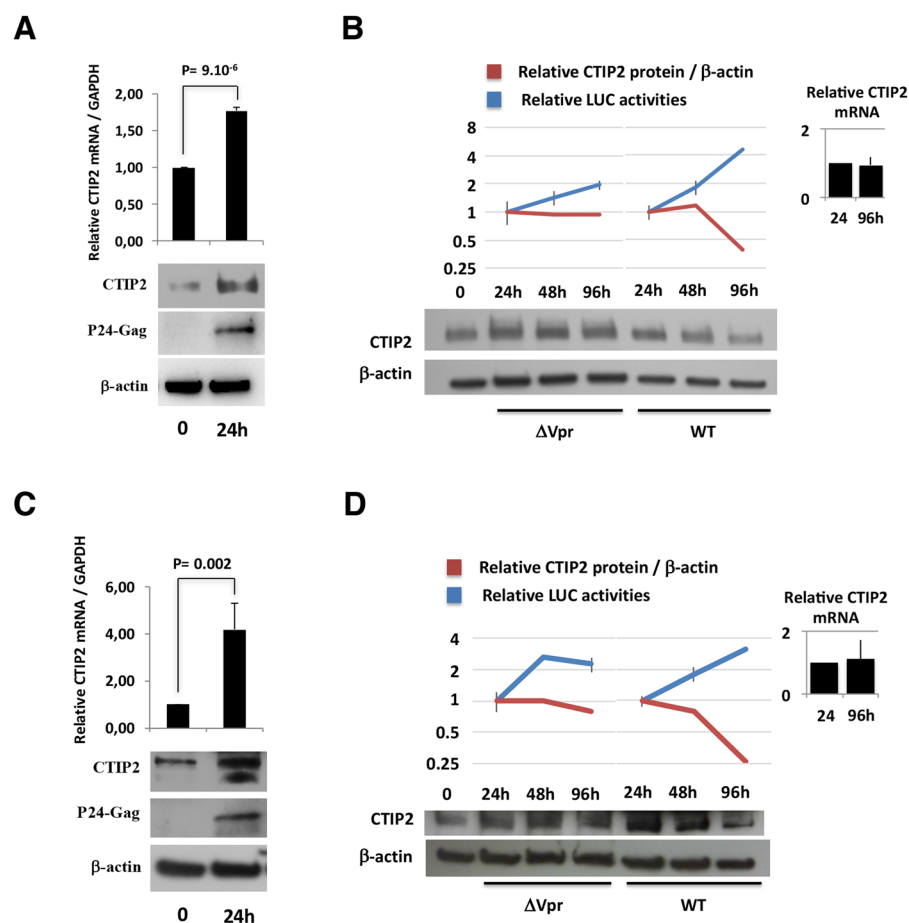


Figure 1. CTIP2-induced expression in infected cells is counteracted by HIV-1 in a Vpr dependent manner. (A,C) Jurkat T cells (A) and Microglial cells (C) were infected with 25×10^3 copies/ml of a VSV-G pseudotyped NL4.3ΔEnv-LUC provirus for 24 h. The presence of CTIP2 in infected cells was assessed by western blot and the CTIP2 mRNA quantified by RT-Q-PCR. (B,D) Jurkat T cells (B) and Microglial cells (D) were infected with 150×10^3 copies/ml of a VSV-G pseudotyped NL4.3ΔEnv-LUC (WT) and a NL4.3ΔEnvΔVpr-LUC (ΔVpr) provirus for 24, 48 and 96 h. The presence of CTIP2 in infected cells was assessed by western blot and the viral expression was quantified by luciferase assay. The quantifications are presented relative to the quantities obtained after 24 h of infection. The results are representative of at least three independent experiments.

activation of the SLX4 complex, Vpr prevents an appropriate innate immune response²². Recently, Vpr has been shown to repress HIV-1 expression by targeting APOBEC3G²³ and an as-yet unidentified macrophage restriction factor²⁴. Finally, two recent papers described that the human silencing hub complex (HUSH) is also targeted to degradation by Vpr and HIV-2/SIV Vpx^{25,26}. Interestingly, the HUSH complex is presented by the authors as a potent restriction factor regulating the transcription step of the viral life cycle.

Here we show that HIV-1 developed a strategy to counteract CTIP2-mediated repression. We report that the viral accessory protein Vpr promotes the degradation of CTIP2 through physical and functional interactions with the Cul4A-DDB1-DCAF1 complex. Vpr targets CTIP2 associated with the heterochromatin-modifying complex. Interestingly, Vpr expression also correlated with a reduced binding of CTIP2 at the HIV-1 promoter and a reactivation of the latent virus in the CHME5-HIV microglial model of latency.

Results

Hiv-1 Expression promotes a vpr-dependent degradation of ctip2. To investigate a possible modulation of CTIP2 expression in response to HIV-1 infection, we measured its protein and its RNA levels in time course experiments in Jurkat T-cells and microglial cells.

Following an initial induction of both CTIP2 mRNA and protein expression after the first 24 h post HIV-1-infection (Fig. 1, panels A and C), CTIP2 protein expression levels decreased in Jurkat T cells (Fig. 1B WT panel) and in microglial cells (Fig. 1D, WT panel) at later time points. Interestingly, while levels of CTIP2 mRNA were not affected along the time course (from 24 h to 96 h of infection), deletion of the Vpr gene (Vpr-deleted virus - ΔVpr) abrogated CTIP2 depletion upon viral expression (Fig. 1B,D, ΔVpr Panels). To confirm that the depletion of CTIP2 mediated by Vpr occurs at a post-transcriptional step, we next overexpressed a FLAG tagged CTIP2 in the presence of normalized quantities of WT and ΔVpr proviruses. The WT-, but not the ΔVpr provirus, promoted a depletion of CTIP2 expressed under the control of a CMV promoter (Figure S1). These results

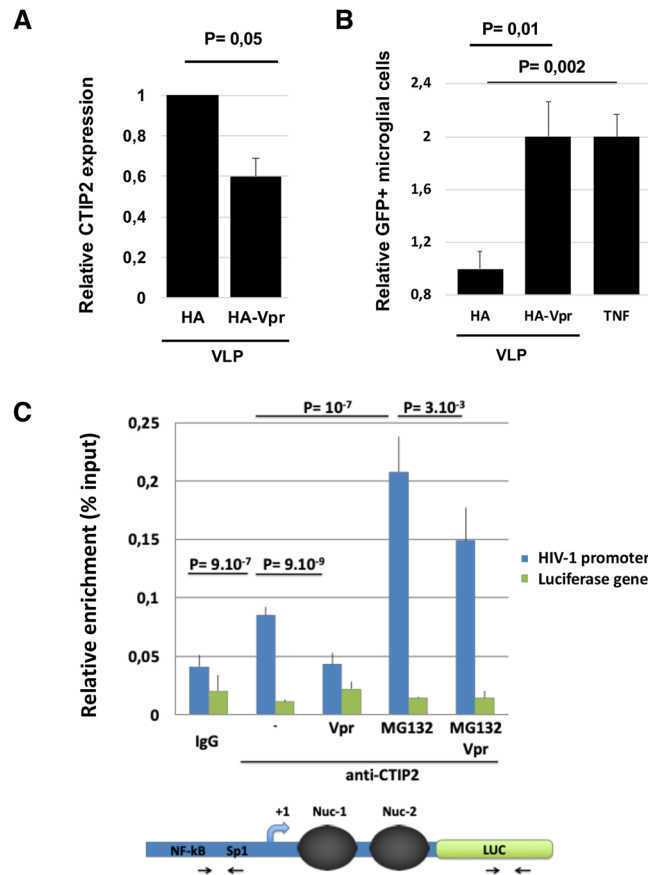


Figure 2. Vpr promotes depletion of CTIP2 in primary CD4+ T cells and at the HIV-1 promoter to induce viral reactivation in microglial cells. (A) Relative CTIP2 expression in CD4 T cells was quantified by flow cytometry. Expression levels in cells incubated with Virus Like-Particles VLP-HA-Vpr were compared to the control VLP-HA particles taken as 1. (B) CHME5-HIV latently infected microglial cell line was infected with VPLs or treated by TNF α . The number of GFP+ cells was quantified by flow cytometry and presented relative to GFP+ cells obtained after VLP-HA infections. (C) Chromatin Immuno-precipitation experiments targeting endogenous CTIP2 at the HIV-1 promoter were performed with chromatin from microglial cells expressing the chromatinized LTR-LUC episomal vector and Vpr as indicated. The cells were subjected or not to MG132 treatment. Enrichments are presented as percentages of the inputs. As a control, the presence of CTIP2 has been concomitantly quantified at the luciferase gene region. Results are representative of at least three independent experiments.

confirmed that CTIP2 expression was impacted post-transcriptionally. Vpr molecules are known to be incorporated into the virions²⁷. To determine if incoming Vpr proteins are sufficient to induce a depletion of CTIP2 in primary cells, we next generated virus-like particles (VLPs) to deliver Vpr in purified CD4+ T cells. As shown in Fig. 2A, incoming Vpr induced a significant depletion of CTIP2 in primary CD4+ T cells, suggesting that Vpr produced in cells upon HIV-1 replication and Vpr delivered by the virions upon infection reduce CTIP2 expression. Since CTIP2 has been described to limit the reactivation of latently integrated viruses in microglial cells⁹, we next investigated the impact of incoming Vpr on the CHME5-HIV microglial model of HIV-1 latency. Interestingly, Vpr delivery increased by two-fold the number of HIV-1 expressing cells (Fig. 2B). This magnitude of reactivation was similar to that obtained with TNF α treatment (Fig. 2B column HA-Vpr vs TNF α). As we previously reported that CTIP2 associates with the latent HIV-1 promoter in microglial cells, we next performed chromatin IP experiments targeting CTIP2 in the presence or not of Vpr (Fig. 2C). As expected, CTIP2 was found associated with the viral promoter but not with the luciferase gene of the construct in microglial cells (Fig. 2C: IgG vs (-) mock CTIP2 IP column). However, Vpr expression significantly reduced the binding of CTIP2 (Fig. 2C: Vpr vs (-) mock), in line with the previously observed depletion of the protein in nuclear extracts. Vpr has been shown to interact directly with the 26S proteasome and to degrade target cellular factors via the proteasome pathway²⁸. We indeed found CTIP2 associated with the 19S subunit of the proteasome but not Vpr (Figure S5). To further determine the mechanism underlying CTIP2 depletion, we next treated the cells with the proteasome inhibitor MG132. As shown, MG132 treatment favored CTIP2 binding to the viral promoter (MG132 vs (-) mock) and strongly impaired the impact of Vpr (MG132+ Vpr vs MG132). Altogether, these results suggest that Vpr produced in cells upon HIV-1 replication and Vpr particles incorporated in virions both contribute to the depletion of CTIP2 in cell lines and primary cells. This depletion correlates with reduced binding of CTIP2

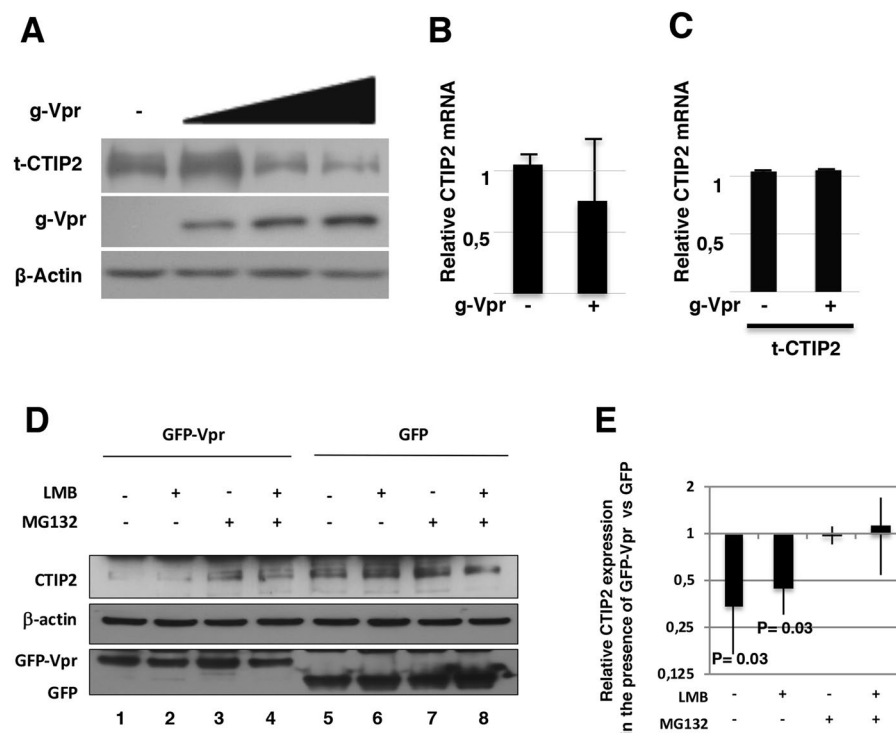


Figure 3. Vpr targets nuclear CTIP2 to degradation via the proteasome pathway. **(A)** Nuclear extracts from HEK cells expressing Tap-CTIP2 (t-CTIP2) and increasing amount of GFP-Vpr (g-Vpr) were analyzed by western blot for the presence of the proteins indicated. **(B,C)** CTIP2 mRNA were quantified by RT-Q-PCR in the presence or not of Vpr in the absence **(B)** and in the presence **(C)** of CTIP2 overexpression. The results are presented relative to the pCDNA3 control vector taken as one. **(D)** Endogenous CTIP2 expression was analyzed by western blot in extracts from cells expressing GFP-Vpr or the control GFP and subjected to the indicated treatments. Cells were treated with 10 ng/ml leptomycin B for 4 h and then with MG132 (5 μg/μl) for 6 h before lysis and nuclear protein extraction. Protein expression was assessed by western blot. **(E)** Expression of CTIP2 in the presence of GFP-Vpr was quantified relative to β-actin and presented relative to the quantities obtained in the presence of the GFP control protein⁵⁷. Results are representative of at least three independent experiments.

at the viral promoter and reactivation of the latent HIV-1. In addition, the impact of MG132 on Vpr-mediated depletion of CTIP2 and the interaction of CTIP2 with the 19S subunit of the proteasome suggest an involvement of the proteasome pathway and a degradation of the protein rather than translational regulation. To further investigate Vpr-induced depletion of CTIP2 biochemically, we next expressed increasing amounts of Vpr in CTIP2 expressing cells. As expected, Vpr expression promoted a dose-dependent depletion of CTIP2 (Fig. 3A). Of note, levels of CTIP2 mRNA from control and from CTIP2-overexpressing cells were not significantly affected by Vpr (Fig. 3B,C, respectively) confirming the post-transcriptional impact of Vpr on CTIP2 expression. To further investigate the involvement of the proteasome pathway, microglial cells were treated with the proteasome inhibitor MG132. In accordance with the ChIP results presented in Fig. 2C, MG132 increased the level of endogenous CTIP2 expression in nuclear extracts (Fig. 3D, row 7 vs 5), suggesting that the physiological turnover of CTIP2 needs a functional proteasome pathway. Again, Vpr reduced CTIP2 expression (Fig. 3D, column 5 vs 1), and MG132 impaired Vpr-mediated depletion of CTIP2 (Fig. 3D, column 1 vs 3). These observations strongly advocate for a degradation of CTIP2 by the proteasome pathway. To determine if this degradation occurs in the nucleus, cells were treated with leptomycin B (LMB), an inhibitor of nuclear export. As shown, LMB treatment did not significantly affect the level of CTIP2 degradation by Vpr (Fig. 3D, column 2 vs 1). We next took advantage of the replicates of these experiments to quantify the impact of Vpr on CTIP2 expression levels in the presence of LMB and MG132. As shown in Fig. 3E, Vpr promoted a more than two-fold depletion of CTIP2 in microglial cells nuclei (first column). However, MG132 abolished the Vpr-mediated depletion of CTIP2 in the presence or absence of LMB (two last columns). Altogether, our results suggest that Vpr degrades CTIP2 via the proteasome pathway in the nuclei of HIV-1 target cells.

Ctip2 Interacts with the cull4/ddb1-dcaf1 ubiquitin ligase complex. Vpr has been reported to target cellular proteins for degradation through recruitment of the Cul4A-DDB1-DCAF1 complex. Since inhibiting the proteasome pathway increased CTIP2 expression levels in the absence of Vpr, we first investigated its possible interaction with the ubiquitin ligase complex. Confocal microscopy observations were performed on microglial cells expressing RFP-CTIP2, GFP-DCAF1, and HA-Vpr alone (Fig. 4A) or in combination (Fig. 4B). As previously described, CTIP2 is localized in dense- and structured-nuclear domains²⁹. The expression of HA-Vpr and GFP-DCAF1 was mainly observed in the nuclear compartment. However, the combined expression of

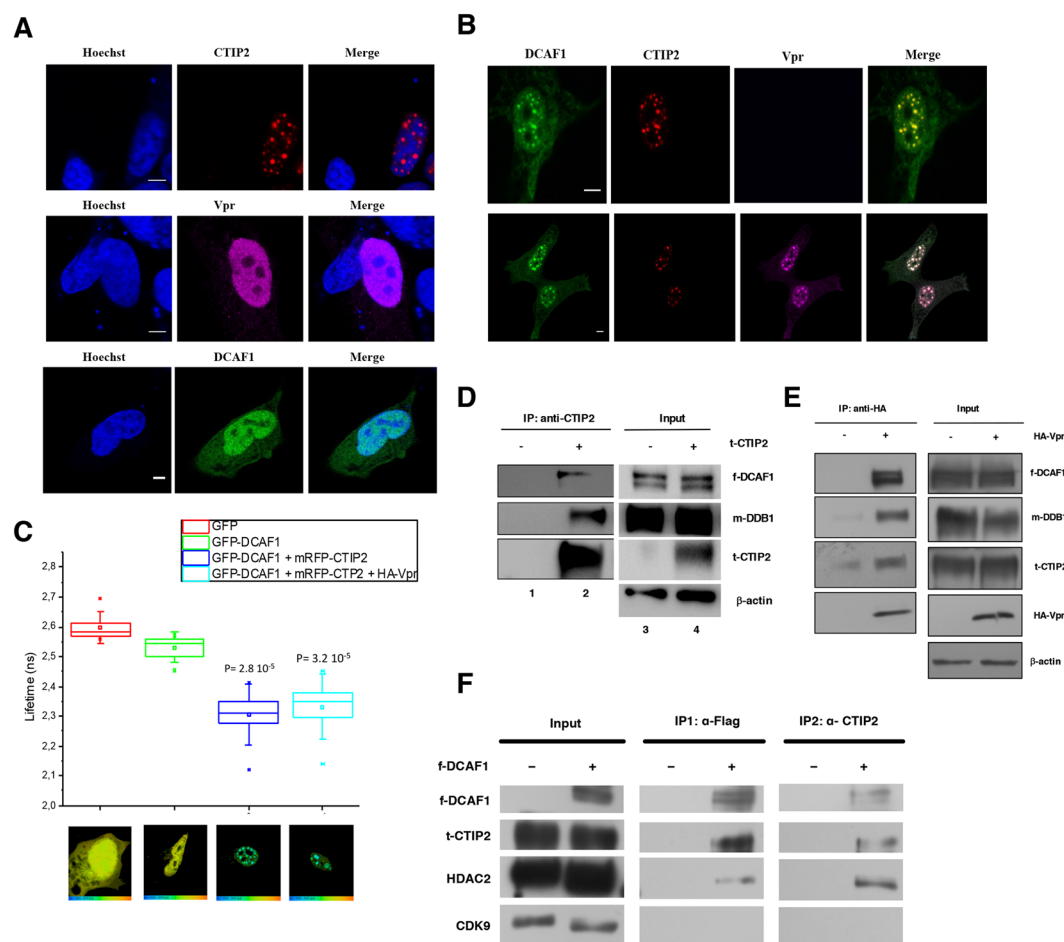


Figure 4. CTIP2 interacts with the Cull4-DDB1-DCAF1 ubiquitin ligase complex. (A,B) Microglial cells expressing RFP-CTIP2, HA-Vpr and GFP-DCAF1 alone (panel A) or in combination (panel B) were subjected to confocal microscopy. Scale bars are set to 5 μ m. (C) Lifetimes from GFP proteins FRET experiments are presented for each condition. The results are representative of 5 independent experiments and from 6 to 10 quantifications for each condition per experiment. (D,E) Nuclear extracts from cells expressing the proteins indicated were subjected to immunoprecipitation experiments targeting Tap-CTIP2 (t-CTIP2) (D) and HA-Vpr (E). The inputs and the immunoprecipitated complexes were analyzed by western blot. (F) Nuclear extracts from cells expressing the proteins indicated were subjected to a first immunoprecipitation targeting FLAG-DCAF1 (f-DCAF) with anti-FLAG antibodies. The DCAF1 associated complexes were eluted by incubation with FLAG peptides and subjected to a second immuno-precipitation targeting CTIP2. The presence of the indicated proteins was analyzed at each step by western blot.

RFP-CTIP2 with GFP-DCAF1 promoted a relocation of DCAF1 proteins to CTIP2-induced structures (Fig. 4B, upper panel). The yellow staining of the CTIP2-induced structures results from this colocalization. Interestingly, Vpr expression further turned the staining of CTIP2 structures white, suggesting a triple colocalization of Vpr, DCAF1 and CTIP2 (Fig. 4B, lower panel). We have previously reported that CTIP2 associates with Vpr in CTIP2-induced nuclear structures⁷. To determine whether CTIP2 interacts directly with DCAF1, we next performed fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments. As shown in Fig. 4C, the presence of RFP-CTIP2 reduced significantly the lifetime of GFP-DCAF1 in the nuclear structures, indicating a direct interaction between these two proteins. Surprisingly, the presence of Vpr did not significantly impact on this effect. To confirm the physical interaction between DCAF1 and CTIP2 biochemically, we performed co-immunoprecipitation experiments targeting first CTIP2. DCAF1 and DDB1 were found in association with CTIP2 (Fig. 4D). These associations are in accordance with the increased CTIP2 expression observed following MG132 treatment. In addition, we found Vpr associated with CTIP2 and the DDB1-DCAF1 complex in nuclear extracts from MG132-treated cells (Fig. 4E). These results suggest that Vpr takes advantage of the cellular degradation machinery to deplete CTIP2 from HIV-1 infected cells and favor HIV-1 expression.

We have reported that CTIP2 associates with two different and exclusive complexes: A complex dedicated to epigenetic silencing of gene expression (chromatin modifying enzymes)⁹ and an inactive form of the P-TEFb elongation complex including the 7SK snRNA¹¹. To characterize CTIP2-associated DCAF1 containing complexes, we performed sequential immunoprecipitation (IP) experiments (Fig. 4F). In the first IP that targeted DCAF1-associated complexes, we found CTIP2 and HDAC2 (chromatin-modifying enzyme) but not CDK9,

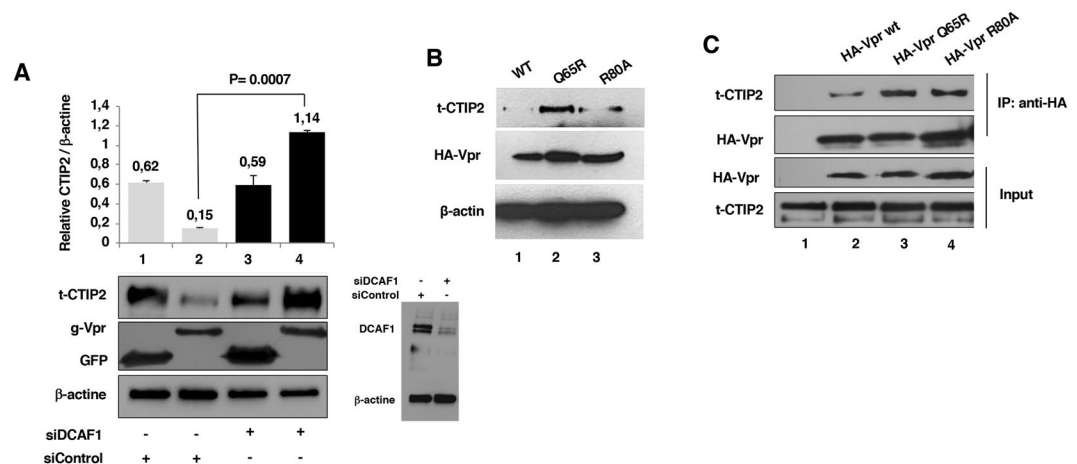


Figure 5. DCAF1 binding is necessary for Vpr-mediated degradation of CTIP2. **(A)** Nuclear extracts from control or DCAF1 knock-down cells were analyzed by western blot for the presence of the indicated proteins in the presence of GFP-Vpr and the control GFP. CTIP2 expression was quantified relative to the loading control using ImageJ software. DCAF1 knock-down efficiency in our experiments is presented. **(B)** Nuclear extracts from cells expressing the indicated proteins were analyzed by western blot. β-actin is presented as a loading control. **(C)** Nuclear extracts from cells expressing large amount of Tap-CTIP2 (t-CTIP2) and the indicated HA-Vpr proteins were subjected to immunoprecipitation experiments targeting the HA tag. The input and the Vpr-associated complexes were analyzed for the presence of CTIP2 by western blot.

the kinase subunit of the P-TEFb complex. This result suggests that DCAF1 may interact with CTIP2 and its chromatin-modifying complex. To confirm that CTIP2, HDAC2 and DCAF1 are part of the same complex, proteins were eluted from the first IP and submitted to a second IP targeting CTIP2. DCAF1 and HDAC2 were found associated with CTIP2 in the eluted DCAF1-containing complex, suggesting that CTIP2, DCAF1 and HDAC2 are members of the same complex (Fig. 4F). Altogether, these results strongly suggest that DCAF1 interacts with and degrades CTIP2 bound to the chromatin modifying enzyme complex (HDAC1/2, SUV39H1) but not with CTIP2 bound to the inactive P-TEFb complex. This conclusion is in accordance with the degradation of HDAC1 by Vpr upon HIV-1 infection (Figure S3 and³⁰).

Association with dcaf1 is crucial for vpr-mediated degradation of ctip2. To further characterize mechanistically the degradation of CTIP2 by Vpr, we explored whether DCAF1 is needed for the Vpr-mediated degradation process by using a Si RNA-based knock-down approach. As expected, depletion of DCAF1 abrogated the degradation of CTIP2 (Fig. 5A column 4 vs 2). We next quantified CTIP2 expression levels in the presence of WT or mutated Vpr proteins (Fig. 5B). The mutations Q65R (which abrogates DCAF1 binding and G2 arrest) and R80A (supports efficient DCAF1 binding but abolishes G2 arrest) were tested^{14,31,32}. As expected, CTIP2 was barely detectable in the presence of WT and R80A Vpr proteins (Fig. 5B columns 1 and 3). However, the Q65R mutation, abolished Vpr-mediated degradation of CTIP2 (Fig. 5B column 2). These results demonstrated that Vpr-mediated G2 arrest does not impact CTIP2 expression and confirmed the requirement for DCAF1 for the depletion of CTIP2 by Vpr. Interestingly, upon a strong overexpression of CTIP2, allowing its detection in the presence of Vpr, we were able to find WT, R80A and Q65R Vpr proteins associated with CTIP2 (Fig. 5C). Thereby, our results suggest that recruitment of DCAF1 is crucial to ensure the Vpr-mediated degradation of CTIP2 but dispensable for the physical interactions between the proteins.

Discussion

CTIP2/Bcl11B is involved both in the establishment and the persistence of HIV-1 latency in CD4+ T cells and microglial cells^{8,9,11,33}. By silencing integrated HIV-1 proviruses and disfavoring its reactivation, this cellular cofactor constitutes a major block to viral expression. To prevent abortive infections, HIV-1 has evolved sophisticated mechanisms to evade innate and adaptive immune responses. Accessory proteins such as Nef, Vif, Vpu, Vpx and Vpr are dedicated to some aspects of this immune evasion. Indeed, several restriction factors are targeted to degradation by these accessory proteins. Vif targets APOBEC3G²³, Vpu targets tetherin by sequestration from the site of budding and proteasomal degradation^{34,35} and Vpx targets SAMHD1². Among the so-called accessory proteins which have to be rather considered as key virulence factors, Vpr remained enigmatic. Vpr is a small protein (around 14 kDa) which is involved in several biological functions including nuclear import of the pre-integration complex³⁶, envelope protein expression and virion production²⁴; HIV-1 transcription³⁷; post-replication DNA repair²¹, HIV-1 gene splicing³⁸, induction of apoptosis³⁹ and cell cycle arrest²² (reviewed in⁴⁰). Vpr is produced upon HIV-1 replication and a significant amount (275 molecules) is incorporated in the new virion²⁷. We report here that Vpr expressed in infected cells (Fig. 1) and incoming-Vpr molecules (Fig. 2) favor the degradation of CTIP2 as previously described for the translocase HTLF²⁰. Interestingly, incoming Vpr is necessary to overcome the HIV-1 transcriptional block observed in dendritic cells⁴¹. The influence of CTIP2 in dendritic cells has not yet been studied. However, our results suggest that Vpr contributes to unlock CTIP2-mediated blocks of HIV-1 gene expression. Vpr has been described associated with the E3 ubiquitin ligase complex to promote a

proteasome-mediated degradation of cellular targets (for review¹⁵). Here we report that CTIP2 interacts with this ubiquitin ligase complex via DCAF1/VprBP. Of note, DCAF1 was reported to interact and to protect Vpr from proteasomal degradation⁴². We found Vpr, CTIP2 and DCAF1 co-localized in dense subnuclear structures, and FRET studies demonstrated a direct association between CTIP2 and DCAF1. These observations suggested to us that Vpr may subvert the proteasome pathway to promote CTIP2 degradation. Interestingly, we showed that CTIP2 protein expression is higher in cells treated with MG132 suggesting a physiological regulation of CTIP2 through the proteasome pathway. Such a CTIP2 protein degradation has been described in a physiological condition such as TCR activation^{43,44}. Therefore, Vpr promotes a constitutive DCAF1-dependent CTIP2 turnover. Such a mechanism of action for Vpr has already been described for UNG2¹⁶ and discussed elsewhere¹⁵. In agreement with this, we show that Vpr enhances the ubiquitination of CTIP2 (Figure S2). An increase of the basal ubiquitination has already been described for HDAC1 and HDAC3, proteins associated with the formation of heterochromatin, the compact-inactive form of the promoters^{30,45}. We further report that Vpr promotes CTIP2 degradation in the nucleus, at the HIV-1 promoter. This observation strongly argues for an indirect impact of Vpr on HIV-1 gene transcription. As a consequence of CTIP2 degradation, Vpr contributes to overcome the transcriptional silencing induced by CTIP2-associated complexes, and to favors Tat function (Figure S4). Interestingly, we found CTIP2, HDAC2 and DCAF1 in the same complex. Since P-TEFb is excluded from this complex, our results suggest that Vpr promotes the degradation of CTIP2 associated with HDAC1/2 and SUV39H1. The concomitant degradation of CTIP2 and HDAC1 (Figure S3) and the recent demonstration that Vpr targets HDAC1 to a proteasome-mediated degradation further support these conclusions³⁰. Moreover, results of a recent screen for factors targeted by the virulence factors Vpr and HIV-2/SIV Vpx strengthen our results^{25,26}. This screen identified the human silencing hub (HUSH) complex as a new target of Vpr^{46,47}. By the degradation of CTIP2 and its associated heterochromatin-promoting enzymes, Vpr unlocks an epigenetic block and activates HIV-1 gene transcription. As commented in⁴⁸, our results suggest a link between the intrinsic immunity and the epigenetic control of HIV-1 gene transcription, which might lead to new ways to combat HIV-1.

There are now several pieces of evidence that Vpr is a key virulence factor. It has been shown to disturb several cellular pathways including cell cycle arrest (reviewed in⁴⁰) and DNA repair (reviewed in⁴⁹). The involvement of Vpr in the latter pathway has been associated with the viral escape from innate immune sensing²². We and others reported that Vpr is involved in the epigenetic regulation of HIV-1 gene transcription. Vpr promotes the degradation of members of chromatin remodeling complexes such as CTIP2, HDAC1³⁰, ZIP and sZIP, the adaptors of the NuRD complex¹⁹. Interestingly CTIP2 recruits NuRD to silence HIV-1 gene transcription in CD4+ T cells¹⁰. Recently, we have shown that PKC-mediated phosphorylation on Ser2 of CTIP2 abrogates the recruitment of NuRD upon activation via the TCR⁵⁰. Post-translational modifications drive the association of CTIP2 with different complexes and thereby determine CTIP2 functions. Whether or not Vpr is able to discriminate between the diverse forms of CTIP2 will require further investigation.

The recognition of Vpr functions in the viral escape from the immune responses in general and in preventing HIV-1 latency, as described in the present article, may have profound therapeutic implications⁵¹. We have recently reviewed the possibilities of targeting post-replication DNA repair complexes to prevent HIV-1 latency⁵². Taking advantage of Vpr-induced depletions of key cellular factors may be an interesting option, as recently described for the post replication DNA repair protein Exo1²¹.

Materials and Methods

Plasmids. Most of the constructs used in our assays have been described previously: pcDNA3, pNTAP, pFLAG-CTIP2 (f-CTIP2), pRFP-CTIP2, pNTAP-CTIP2 (t-CTIP2) were used^{8,9,11}. pGFP-Vpr WT (g-Vpr), pNL-4.3 ΔEnv-luc wt, pNL-4.3 ΔEnv-luc ΔVpr¹⁹ and pMyc-DDB1 (m-DDB1), pFLAG-DCAF1 (f-DCAF1), pHA-Vpr wt, pHA-Vpr Q65R were kindly provided by Dr. F. Margottin-Goguet.

Cell culture. The human microglial (provided by M. Tardieu, Paris, France)⁵³, HEK293T and CHME5-HIV cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and Jurkat cell line in RPMI 1640. The culture mediums were completed with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 100 U/mL penicillin/streptomycin. Where indicated, the cells were treated with MG132 (5 μg/μl) for 6 h, 10.0 ng/ml leptomycin B (LMB) for 5 h before harvesting the cells.

Antibodies and reagents. CTIP2 (ab18465) antibodies were purchased from Abcam, BCL11b (A300–384A) from Bethyl Laboratories, CDK9 (sc-8338), Myc epitope (9 E10), mouse and rat HRP-conjugated from Santa Cruz Biotechnology, anti-FLAG M2 affinity gel and β-actin (A5441) from Sigma-Aldrich, and anti-HA.11 Tag Antibody (AFC-101P) was from Eurogentec. Rabbit HRP-conjugated antibodies were purchased from Thermo Fisher Scientific, anti-GFP (632592) from Clontech, and Protein G Magnetic beads from Millipore. MG132 and leptomycin B molecules were provided by Sigma-Aldrich, and the protease inhibitor mixture by Roche. VprBP (DCAF1) and non-targeting siRNAs were from Dharmacon. SYBR Select Master Mix used for Q-PCR was from Thermo Fisher. CTIP2-FITC (25B6) ab123449 and IgG control were purchased from Abcam. Anti-HA.11-AF647 was used for the confocal microscopy observations.

HIV-1 infections and viral production in cell lines. The VSV-G pseudotyped ΔEnv-LUC HIV-1 viruses were produced by transfecting the pNL4.3 ΔEnv-LUC HIV-1 (WT) or pNL4.3 ΔEnvΔVpr-LUC HIV-1 (ΔVpr) constructs together with the VSV-G expression plasmid in 293 T cells. 48 h after transfection, the culture supernatants were collected and viral production was measured by clinical HIV-1 viral load test (quantification of the genomic RNAs).

CTIP2 expression in primary CD4+ T cells infected with VLP. Primary CD4+ T cells were isolated and purified from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy blood donors by positive

selection using CD4 MicroBeads selection kits and autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec) as previously described^{54,55}. CD4⁺ T lymphocytes were activated with phytohemagglutinin A (PHA) (2 µg/ml) (Sigma-Aldrich) for 3 days in RPMI 1640 plus Gibco GlutaMAX medium (Thermo Fisher) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Cells were stored frozen. They were thawed the night before use. CD4 T cells were incubated with Viral-like particles VLP-HA or VLP-HA-Vpr (obtained from FMG) at 0.1 µg for 0.1 million cells for 1 days. For the quantification of intracellular CTIP2 expression, cells were incubated for 10 min at 4 °C with CD3 cell surface molecules before fixation with the Cytofix solution (BD Biosciences) and permeabilized with a solution of 0.1% Triton X-100. CTIP2 or IgG control isotype were incubated for 30 min at 4 °C. After extensive washing, the percentage of CD3-PEC T cells positive for CTIP2 expression was defined by flow cytometry (MACSQuant, Miltenyi) and analyzed with Kaluza software.

Co-immunoprecipitation assays and western blotting. Cells cultured in 150-mm diameter dishes were transfected using a calcium phosphate co-precipitation method with the plasmids indicated. Lysates were prepared two days post-transfection as previously described¹¹. Immunoprecipitations were performed using the standard technique, as in¹¹. Finally, the immunoprecipitated complexes were processed for SDS-PAGE and immunoblot analysis. Proteins were visualized by chemiluminescence using the SuperSignal Chemiluminescence Detection System (Thermo Fisher).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). Cells expressing the chromatinized HIV-1 episomal LTR-luciferase construct were subjected to ChIP experiments with IgG control or anti-CTIP2 IgG antibodies, as in^{8,9}. The presence of CTIP2 at the promoter- or the luciferase gene- regions was quantified by qPCR. Results are presented as percentages of inputs. Values are representative of three independent experiments.

Confocal microscopy. Microglial cells were transfected in 24-well glass-bottomed plates (Greiner Bio-One, Ref. 662892) with a DNA mixture containing eGFP-DCAF1, mRFP-CTIP2 or HA-Vpr. At 24 h post-transfection, cells were extensively washed, fixed with 4% PFA/PBS solution and kept in 1x PBS at 4 °C until observation with a Leica SPE confocal microscope equipped with a Leica 63x1.4NA oil immersion objective (HXC PL APO 63x/1.40 OIL CS).

Immunofluorescence staining. Microglial cells expressing HA-tagged Vpr were immunodetected as described before⁵⁶. Anti-HA (BioLegend, 901501) was diluted 1/1000 and Alexa Fluor goat anti-mouse (A-21237, Thermo Fisher) 1/250. Cells were analyzed by confocal microscopy.

Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). Time-correlated single-photon counting FLIM was performed on a home-made laser scanning set-up based on an Olympus IX70 inverted microscope with an Olympus 60× 1.2NA water immersion objective, as described⁵⁶. Two-photon excitation at 900 nm was provided by an InSight DeepSee laser (Spectra Physics). For FLIM, the laser power was adjusted to give count rates with peaks up to as few as 10⁶ photons.s⁻¹, so that the pile-up effect can be neglected. Photons were collected using a short pass filter with a cut-off wavelength of 680 nm (F75-680, AHF, Germany), and a band-pass filter of 520 ± 17 nm (F37-520, AHF, Germany). The fluorescence was directed to a fiber-coupled APD (SPCM-AQR-14-FC, Perkin Elmer), which was connected to a time-correlated single photon counting module (SPC83, Becker and Hickl, Germany). Typically, the samples were scanned continuously for about 60 s to achieve appropriate photon statistics to analyze the fluorescence decays. The FRET phenomenon causes a decrease in the fluorescent lifetime (τ) of the donor, which can be measured by the FLIM technique at each pixel or group of pixels. Experiments were performed with eGFP as a FRET donor and mRFP as acceptor. The FRET efficiency (E) was calculated according to: $E = 1 - \tau_{DA}/\tau_D = 1/1 + (R/R_0)^6$ where τ_{DA} is the lifetime of the donor in the presence of the acceptor and τ_D is the lifetime of the donor in the absence of the acceptor. A Förster R_0 distance (where the transfer efficiency is 50%) of 56 Å was calculated between eGFP used as a donor and mRFP used as acceptor.

Luciferase assays. Microglial cells cultured in 48-well plates were transfected with the indicated vectors and the CMV-Renilla luciferase control vector using the calcium phosphate co-precipitation method. Two days later, cells were collected and firefly luciferase activity was determined using the Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) and normalized to the Renilla luciferase activity. Values correspond to an average of at least three independent experiments performed in triplicates.

mRNA quantification. The total RNA was extracted using an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. Using SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) and oligo (dT)12–18 Primers (Thermo Fisher), RNA was reverse transcribed into cDNA. The cDNA was diluted 10-fold with DNase-free water. Quantitative PCR was performed on the diluted cDNA using SYBR Select Master Mix. Primers used in qPCR include: CTIP2-F 5'-ATTGGAACCTGCCACTTG-3', CTIP2-R 5'-TTTGCTGTGTTCCACGA-3' GAPDH-F5'-GAGAAGGCTGGGGCTCATTT-3', GAPDH-R 5'-GCAGTGATGGCATGGACTGT-3'. Data were normalized to GAPDH and calculated using the 2^{-($\Delta\Delta CT$)} method.

Statistical analysis. Data were statistically analyzed by using t tests with Excel (Microsoft) or StatView (SAS Institute Inc.). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Results were expressed as S.D. and represent data from a minimum of three independent experiments.

References

- Descours, B. *et al.* SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells. *Retrovirology* **9**, 87 (2012).
- Laguette, N. *et al.* SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* **474**, 654–7 (2011).
- Lahouassa, H. *et al.* SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* **13**, 223–8 (2012).
- Le Douce, V., Cherrier, T., Riclet, R., Rohr, O. & Schwartz, C. The Many Lives of CTIP2: From AIDS to Cancer and Cardiac Hypertrophy. *J. Cell. Physiol.* **229**, 533–537 (2014).
- Le Douce, V. *et al.* HIC1 controls cellular- and HIV-1- gene transcription via interactions with CTIP2 and HMGA1. *Sci. Rep.* **6**, 34920 (2016).
- Marban, C. *et al.* Targeting the Brain Reservoirs: Toward an HIV Cure. *Front. Immunol.* **7**, 397 (2016).
- Cherrier, T. *et al.* p21(WAF1) gene promoter is epigenetically silenced by CTIP2 and SUV39H1. *Oncogene* **28**, 3380–9 (2009).
- Le Douce, V. *et al.* LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1904–15 (2012).
- Marban, C. *et al.* Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *Embo J* **26**, 412–423 (2007).
- Cismasiu, V. B. *et al.* BCL11B functionally associates with the NuRD complex in T lymphocytes to repress targeted promoter. *Oncogene* **24**, 6753–6764 (2005).
- Cherrier, T. *et al.* CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 12655–60 (2013).
- Eilebrecht, S. *et al.* HMGA1 recruits CTIP2-repressed P-TEFb to the HIV-1 and cellular target promoters. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4962–71 (2014).
- Mashiba, M. & Collins, K. L. Molecular mechanisms of HIV immune evasion of the innate immune response in myeloid cells. *Viruses* **5**, 1–14 (2013).
- Le Rouzic, E. *et al.* HIV1 Vpr arrests the cell cycle by recruiting DCAF1/VprBP, a receptor of the Cul4-DDB1 ubiquitin ligase. *Cell Cycle* **6**, 182–8 (2007).
- Romani, B. & Cohen, E. A. Lentivirus Vpr and Vpx accessory proteins usurp the cullin4-DDB1 (DCAF1) E3 ubiquitin ligase. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 755–63 (2012).
- Wen, X., Casey Klockow, L., Nekorchuk, M., Sharifi, H. J. & de Noronha, C. M. C. The HIV1 protein Vpr acts to enhance constitutive DCAF1-dependent UNG2 turnover. *PLoS One* **7**, e30939 (2012).
- Casey Klockow, L. *et al.* The HIV-1 protein Vpr targets the endoribonuclease Dicer for proteasomal degradation to boost macrophage infection. *Virology* **444**, 191–202 (2013).
- Okumura, A. *et al.* HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation. *Virology* **373**, 85–97 (2008).
- Maudet, C. *et al.* HIV-1 Vpr induces the degradation of ZIP and sZIP, adaptors of the NuRD chromatin remodeling complex, by hijacking DCAF1/VprBP. *PLoS One* **8**, e77320 (2013).
- Lahouassa, H. *et al.* HIV-1 Vpr degrades the HLTf DNA translocase in T cells and macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 5311–6 (2016).
- Yan, J. *et al.* HIV-1 Vpr Reprograms CLR4^{DCAF1} E3 Ubiquitin Ligase to Antagonize Exonuclease 1-Mediated Restriction of HIV-1 Infection. *MBio* **9** (2018).
- Laguette, N. *et al.* Premature activation of the SLX4 complex by Vpr promotes G2/M arrest and escape from innate immune sensing. *Cell* **156**, 134–45 (2014).
- Zhou, D. *et al.* The HIV-1 accessory protein Vpr induces the degradation of the anti-HIV-1 agent APOBEC3G through a VprBP-mediated proteasomal pathway. *Virus Res.* <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.08.021> (2014).
- Mashiba, M., Collins, D. R., Terry, V. H. & Collins, K. L. Vpr overcomes macrophage-specific restriction of HIV-1 Env expression and virion production. *Cell Host Microbe* **16**, 722–35 (2014).
- Yurkovetskiy, L. *et al.* Primate immunodeficiency virus proteins Vpx and Vpr counteract transcriptional repression of proviruses by the HUSH complex. *Nat. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0256-x> (2018).
- Chougui, G. *et al.* HIV-2/SIV viral protein X counteracts HUSH repressor complex. *Nat. Microbiol.* **3**, 891–897 (2018).
- Müller, B., Tessmer, U., Schubert, U. & Kräusslich, H. G. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. *J. Virol.* **74**, 9727–9731 (2000).
- Li, G. *et al.* HIV-1 replication through hHR23A-mediated interaction of Vpr with 26S proteasome. *PLoS One* **5**, e11371 (2010).
- Rohr, O. *et al.* 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 (2003).
- Romani, B., Baygloo, N. S., Hamidi-Fard, M., Aghasadeghi, M. R. & Allahbakhshi, E. HIV-1 Vpr Protein Induces Proteasomal Degradation of Chromatin-associated Class I HDACs to Overcome Latent Infection of Macrophages. *J. Biol. Chem.* **291**, 2696–711 (2016).
- DeHart, J. L. *et al.* HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system. *Virol. J.* **4**, 57 (2007).
- Ly, L. *et al.* Vpr Targets TET2 for Degradation by CRL4 VprBP E3 Ligase to Sustain IL-6 Expression and Enhance HIV-1 Replication. *Mol. Cell* **70**, 961–970.e5 (2018).
- Cismasiu, V. B. *et al.* 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 (2008).
- Mitchell, R. S. *et al.* Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. *PLoS Pathog.* **5**, e1000450 (2009).
- Douglas, J. L. *et al.* Vpu directs the degradation of the human immunodeficiency virus restriction factor BST-2/Tetherin via a {beta} TrCP-dependent mechanism. *J. Virol.* **83**, 7931–47 (2009).
- Popov, S. *et al.* Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO J.* **17**, 909–17 (1998).
- Kino, T. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory protein Vpr induces transcription of the HIV-1 and glucocorticoid-responsive promoters by binding directly to p300/CBP coactivators. *J. Virol.* **76**, 9724–34 (2002).
- Kuramitsu, M. *et al.* A novel role for Vpr of human immunodeficiency virus type 1 as a regulator of the splicing of cellular pre-mRNA. *Microbes Infect.* **7**, 1150–60 (2005).
- Nishizawa, M., Kamata, M., Mojin, T., Nakai, Y. & Aida, Y. Induction of apoptosis by the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 occurs independently of G(2) arrest of the cell cycle. *Virology* **276**, 16–26 (2000).
- Guenzel, C. A., Hérat, C. & Benichou, S. HIV-1 Vpr-a still “enigmatic multitasker”. *Front. Microbiol.* **5**, 127 (2014).
- Miller, C. M. *et al.* Virion-Associated Vpr Alleviates a Postintegration Block to HIV-1 Infection of Dendritic Cells. *J. Virol.* **91**, e00051–17 (2017).
- Le Rouzic, E. *et al.* Assembly with the Cul4A-DDB1^{DCAF1} Ubiquitin Ligase Protects HIV-1 Vpr from Proteasomal Degradation. *J. Biol. Chem.* **283**, 21686–21692 (2008).
- Zhang, L. *et al.* 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 (2012).
- Selman, W. H., Esfandiari, E. & Filtz, T. M. Alteration of Bcl11b upon stimulation of both the MAP kinase- and Gsk3-dependent signaling pathways in double-negative thymocytes. *Biochem. Cell Biol.* **97**, 201–213 (2019).

45. Romani, B. *et al.* HIV-1 Vpr reactivates latent HIV-1 provirus by inducing depletion of class I HDACs on chromatin. *Sci. Rep.* **6**, 31924 (2016).
46. Robbez-Masson, L. *et al.* The HUSH complex cooperates with TRIM28 to repress young retrotransposons and new genes. *Genome Res.* **28**, 836–845 (2018).
47. Tchasovnikarova, I. A. *et al.* Epigenetic silencing by the HUSH complex mediates position-effect variegation in human cells. *Science* (80-.). **348**, 1481–1485 (2015).
48. Van Lint, C. Stop HUSHing on SIV/HIV. *Nat. Microbiol.* **3**, 1336–1338 (2018).
49. Brégnard, C., Benkirane, M. & Laguet, N. DNA damage repair machinery and HIV escape from innate immune sensing. *Front. Microbiol.* **5**, 176 (2014).
50. Dubuissez, M. *et al.* 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**, 1881–98 (2016).
51. Schwartz, C. *et al.* On the way to find a cure: Purging latent HIV-1 reservoirs. *Biochem. Pharmacol.*, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.07.001> (2017).
52. Schwartz, C., Rohr, O. & Wallet, C. Targeting the DNA-PK complex: its rationale use in cancer and HIV-1 infection. *Biochem. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.12.002> (2018).
53. Janabi, N., Peudenier, S., Héron, B., Ng, K. H. & Tardieu, M. 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 (1995).
54. Su, B. *et al.* Neutralizing antibodies inhibit HIV-1 transfer from primary dendritic cells to autologous CD4 T lymphocytes. *Blood* **120**, 3708–3717 (2012).
55. Holl, V. *et al.* Stimulation of HIV-1 Replication in Immature Dendritic Cells in Contact with Primary CD4 T or B Lymphocytes. *J. Virol.* **84**, 4172–4182 (2010).
56. Fritz, J. V. *et al.* Direct Vpr-Vpr interaction in cells monitored by two photon fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence lifetime imaging. *Retrovirology* **5**, 87 (2008).
57. McDonald, D., Carrero, G., Andrin, C., de Vries, G. & Hendzel, M. J. Nucleoplasmic beta-actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. *J. Cell Biol.* **172**, 541–52 (2006).

Acknowledgements

We are grateful to Andrea Janossy for careful and critical reading of the manuscript, and to James Hutchins for correcting the scientific English. Work in the OR laboratory was supported by grants from the French Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ARNS), Sidaction, the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 691119 — EU4HIVCURE — H2020-MSCA-RISE-2015, Alsace Contre le Cancer, Institut Universitaire de France and university of Strasbourg.

Author Contributions

F.F., A.S., D.R.M., D.C., E.H., E.M.M., D.F., V.A.J. and W.C. performed experiments. A.A.A., B.E., M.C. and M.G.F. provided technical resources, scientific and technical expertise. V.L.C., S.C. and R.O. designed and supervised the experiments, wrote the draft and provided funds.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48689-x>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

2. Publication n°2

Analysis of RNA binding properties of human Ku protein reveals its interactions with 7SK snRNA and protein components of 7SK snRNP complex

Shadrina O, Garanina I, Korolev S, Zatsepin T, Van Assche J, Daouad F, Wallet C, Rohr O, Gottikh M. Analysis of RNA binding properties of human Ku protein reveals its interactions with 7SK snRNA and protein components of 7SK snRNP complex.

Biochimie. 2020 Apr-May;171-172:110-123.

doi: 10.1016/j.biochi.2020.02.016. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32105815.

La protéine Ku formée par les hétérodimères Ku70 et Ku80 a comme principale fonction de participer à la réparation des cassures double brin de l'ADN via le mécanisme NHEJ (non-homologous end-joining DNA repair). Elle est de ce fait, décrite comme une protéine pouvant se lier à l'ADN. Cependant, plusieurs études ont démontré que Ku pouvait également interagir avec les ARN mais les mécanismes précis de ces interactions ne sont pour l'instant que très peu décrits. Dans cette étude, une structure consensus spécifique a été proposée pour la liaison de Ku à différents ARN. Cette structure en épingles à cheveux possède un renflement à la fin de la boucle, proche d'une séquence GpG. Des structures identiques ont été retrouvées sur les petits ARN nucléaires 7SK et sur les ARN TAR du VIH-1. Ainsi, il a été démontré que Ku se lie aux ARN TAR et 7SK qui sont impliqués dans la transcription du VIH-1. Cette étude a démontré qu'en plus d'interagir avec l'ARN 7SK, Ku interagit également avec certaines protéines qui composent le complexe 7SK snRNP notamment Cdk9 et HEXIM1. L'interaction Ku-Cdk9 est indépendante de la présence d'ARN. En revanche, un traitement aux RNAses impacte de façon négative l'interaction avec HEXIM1, ce qui indique que cette interaction est ARN-dépendante et plus spécifiquement dépendante de l'ARN 7SK. Le laboratoire DHPI a démontré que le facteur de transcription cellulaire CTIP2 s'associait avec l'ARN sn7SK et HEXIM1 et qu'il maintenait le complexe PTEF-b sous forme inactive. Dans cette étude sur les interactions de Ku avec différents ARN, nous avons démontré l'interaction entre Ku et CTIP2 par immunoprécipitation et microscopie confocale. En conclusion, Ku se lie aux

ARN TAR et 7SK qui sont impliqués dans la régulation de la transcription du VIH-1. De ce fait, Ku pourrait également être impliqué dans cette régulation. Enfin, l'association de Ku avec la forme inactive du complexe PTEF-b ainsi qu'avec CTIP2 (aussi associé au complexe PTEF-b inactif), suggère une implication de Ku dans la régulation de l'expression des gènes du VIH-1 via ce complexe.

Dans cette publication, j'ai contribué à la production de résultats expérimentaux ainsi qu'au processus de révision.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi



Research paper

Analysis of RNA binding properties of human Ku protein reveals its interactions with 7SK snRNA and protein components of 7SK snRNP complex

Olga Shadrina^{a,b,*}, Irina Garanina^c, Sergey Korolev^{a,b}, Timofei Zatsepin^{a,d}, Jeanne Van Assche^e, Fadoua Daouad^e, Clementine Wallet^e, Olivier Rohr^e, Marina Gottikh^{a,b}

^a Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 199991, Russia

^b Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Russia

^c Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119435, Russia

^d Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, 121205, Russia

^e Université de Strasbourg, EA7292, FMTS, IUT Louis Pasteur, Schiltigheim, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 November 2019

Accepted 21 February 2020

Available online 24 February 2020

Keywords:

Human Ku protein

RNA binding

7SK snRNA

7SK ribonucleoprotein complex

HEXIM1

ABSTRACT

Human Ku heterodimeric protein composed of Ku70 and Ku80 subunits plays an important role in the non-homologous end-joining DNA repair pathway as a sensor of double strand DNA breaks. Ku is also involved in numerous cellular processes, and in some of them it acts in an RNA-dependent manner. However, RNA binding properties of the human Ku have not been well studied. Here we have analyzed interactions of a recombinant Ku heterodimer with a set of RNAs of various structure as well as eCLIP (enhanced crosslinking and immunoprecipitation) data for human Ku70. As a result, we have proposed a consensus RNA structure preferable for the Ku binding that is a hairpin possessing a bulge just near GpG sequence-containing terminal loop. 7SK snRNA is a scaffold for a ribonucleoprotein complex (7SK snRNP), which is known to participate in transcription regulation. We have shown that the recombinant Ku specifically binds a G-rich loop of hairpin 1 within 7SK snRNA. Moreover, Ku protein has been co-precipitated from HEK 293T cells with endogenous 7SK snRNA and such proteins included in 7SK snRNP as HEXIM1, Cdk9 and CTIP2. Ku and Cdk9 binding is found to be RNA-independent, meanwhile HEXIM1 and Ku co-precipitation depended on the presence of intact 7SK snRNA. The latter result has been confirmed using recombinant HEXIM1 and Ku proteins. Colocalization of Ku and CTIP2 was additionally confirmed by confocal microscopy. These results allow us to propose human Ku as a new component of the 7SK snRNP complex.

© 2020 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

The Ku protein is a highly abundant protein in mammalian cells made up by two subunits, Ku70 and Ku80 [1]. The most well-known Ku function is participation in the repair of DNA double-strand breaks (DSBs) through the non-homologous end joining (NHEJ) pathway where the Ku heterodimer acts as the main sensor of DSBs. Being bound to DNA ends, Ku recruits the catalytic subunit

of DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) and forms the trimeric complex DNA-PK, which triggers a cascade of phosphorylation events required for the subsequent DSB repair [2–4]. In addition to NHEJ, Ku is involved in various cellular processes such as V(D)J recombination, AP-site repair, telomere maintenance, apoptosis, transcription, and translation [1,5–9]. Its exact function in these processes remains the subject of intensive research. In particular, one cannot rule out a possibility of RNA-mediated participation of Ku in some of these processes. Indeed, even in the well-studied DSB repair, a direct role of RNA has been revealed in recent works [10–12]. In particular, the noncoding RNA LINP1 acts as a scaffold that links Ku and DNA-PKcs and enables efficient

* Corresponding author. Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 199991, Russia.

E-mail address: oashadrina92@gmail.com (O. Shadrina).

DNA repair through the NHEJ pathway in breast cancer cells [12].

Accumulating evidence demonstrates that Ku acts as an RNA binding protein in telomere-length maintenance in yeast [13–17] and in human cells [18]. There is no sequence similarity between the RNA components of yeast and human telomerases, but in both RNAs Ku associates with similar stem-loop structures [14,18]. The interaction between the Ku heterodimer and telomerase RNA (TLC1) from *Saccharomyces cerevisiae* is required for proper recruitment of yeast telomerase to the chromosome end and telomere synthesis [15,19].

Ku participation in translation can also be mediated by its interaction with RNA. For example, Ku70 is found to bind the 5'-UTR elements of mRNAs of some growth factors, and this finding provides data to propose a role for Ku in the modulation of IRES-mediated mRNA translation [20]. Both Ku subunits are identified in a screen for proteins' binding to the 5'-UTR of the mRNA encoding the tumor suppressor protein p53, a master gene regulator of the DNA damage response [21]. The Ku binding with p53 mRNA results in repression of p53 protein synthesis and p53-mediated apoptosis and the translational repression is relieved after genotoxic stress due to Ku acetylation, which disrupts Ku-p53 mRNA interactions [6].

Another important cellular process where Ku participation might be mediated by its binding to RNA is alien DNA sensing and innate immune response. Several works have shown that Ku (alone or in its complex with DNA-PKcs) can activate an innate immune response when it detects foreign DNA [22–25]. Recently, it has been found that Ku is involved in DNA-mediated innate immune response being a component of a multi-subunit RNP complex, in which several proteins are associated with a long non-coding RNA NEAT1 [26]. This RNA is known as a paraspeckle marker [27], and in addition to Ku70, Ku80 and DNA-PKcs, this RNP complex also contains paraspeckle proteins (SFPQ, NONO, PSPC1, RBM14, and MATRIN3). Another interesting component of the RNP is hexamethylene-bis-acetamide-inducible protein 1 (HEXIM1), an RNA-binding protein involved in the control of transcription elongation by RNA polymerase II (RNAPII) [28,29]. Among all the proteins listed above, only SFPQ, HEXIM1, and Ku70 have been found to be co-localized with the NEAT1 accordingly to immunofluorescence *in situ* hybridization in HeLa cells. This data allows supposing a direct interaction of Ku70 with RNA NEAT1.

It should also be noted that Ku has been found to associate with RNA helicase A (RHA) [30], a multifunctional protein, which is involved in several steps of RNA metabolism, such as RNA processing, cellular transit of viral molecules, ribosome assembly, regulation of transcription, and translation of specific mRNAs [31]. Interestingly, Ku was immunoprecipitated with RHA in an RNA-dependent manner, and both proteins were identified in hnRNP complexes [30]. Moreover, in these complexes, DNA-PK consisting of Ku protein and a kinase subunit (DNA-PKcs) was able to perform RNA-dependent phosphorylation of hnRNP proteins and of RHA [30]. It was a surprising result since previously DNA-PK had been believed to exhibit its phosphorylating activity only after binding to DNA, but not RNA [32,33]. However, later it was shown that DNA-PK could phosphorylate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1), and its phosphorylation is stimulated by the presence of both DNA and the telomerase RNA component, hTR [34].

Participation of Ku protein in the transcription regulation of cellular and viral genes has been extensively studied [35–40], and no uniform mechanism has been revealed. Nothing is known about Ku interactions with any RNA during transcription regulation. However, Ku has been found to interact with TAR (trans-activation response) RNA [41] forming a hairpin structure located at the 5'-end of the synthesized mRNA and known as a key player in active transcription from the HIV-1 promoter [42–44]. Therefore, one

cannot rule out that at least the viral transcription regulation by Ku could be mediated by some Ku-RNA interplays.

The structural aspects of Ku-RNA binding have been well studied for the yeast Ku protein, and a minimum consensus structure for a Ku-binding site within RNAs has been proposed [16]. It represents a bulged stem-loop structure, and the presence of UA or UG bulge, and the size of the terminal loop, but not the loop sequence are the most important marks for Ku recognition. For *Saccharomyces cerevisiae*, it has been shown that Ku defective in DNA binding also loses its affinity to telomerase RNA (TLC1) [13]. This result allows considering that the yeast Ku protein has the same binding site for both types of nucleic acids. Interaction of Ku from mammalian cells with different RNA structures is less studied, but the existing data show that the human protein also prefers stem-loop RNAs containing a bulge [6,18]. Analysis of Ku binding with TAR RNA demonstrates that, in contrast to the yeast protein, the loop sequence may be important for recognition by human Ku [41]. Besides, a series of RNA aptamers for Ku heterodimer has been developed [33], however, the nature of their binding to Ku has not been clarified.

Here we have analyzed structural aspects of RNA interactions with human Ku heterodimer based on the results of eCLIP (enhanced crosslinking and immunoprecipitation) experiments available from ENCODE database, and our experimental study of recombinant Ku binding with different RNA molecules. As a result, we could propose a consensus RNA structure favorable for the Ku binding, which is a hairpin containing a bulge within a few nucleotides from the loop and possessing GpG sequence in the terminal loop. Also, we investigated Ku interplay with a non-coding small nuclear 7SK RNA (7SK snRNA), which is a scaffold for a ribonucleoprotein complex (7SK snRNP) participating in transcription regulation [45]. We have found that Ku binds mainly the hairpin 1 containing the most G-rich loop in the complex secondary structure of 7SK snRNA. Interestingly, the hairpin 1 is involved in 7SK snRNA interaction with HEXIM1 protein, an RNA-binding protein well-known as an inhibitor of the positive transcription elongation factor b (P-TEFb), which controls transcription elongation by RNAPII [29,46]. Of note, Ku does not compete with HEXIM1 for binding to 7SK snRNA, since we detected formation of a ternary complex composed of both proteins and 7SK snRNA. Ku has been co-precipitated with HEXIM1 from cells, however RNase treatment destroyed HEXIM1-Ku complex. Moreover, Ku interacts with some other proteins of the 7SK snRNP complex, namely cyclin-dependent kinase 9 (Cdk9), which is the part of P-TEFb, and the cellular repressor CTIP2. It is known that 7SK snRNA links HEXIM1 and CTIP2 to Cdk9 and CyclinT1 in an inactive form of the P-TEFb complex [47]. Basing on the results obtained we can consider Ku protein as a new component of the 7SK snRNP complex.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids

For the construction of heterodimer Ku expression, vector pET15b_His6_Ku70_(-1 nt)_Ku80, PCR with primers Ku70-N-NdeI (5'-CATATGTCAGGGTGGGAGTCATTACA-3') and Ku70-C-BamHI (5'-GGATCCGCTCTGGAAGTGCTTGGTGA-3') was used to amplify the human Ku70 coding sequence (corresponded to NP_001275905.1) from pGEX-6p-1-Ku70 without a stop codon [48], and the product predigested with NdeI and BamHI restriction endonucleases (Thermo Fisher Scientific, USA) was cloned between NdeI and BamHI sites into a pET15b vector (Merk Millipore, USA). A new XhoI restriction site was added following by the BamHI site in the resulted plasmid by site-directed mutagenesis (Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies, USA) with

primers (5'-AACAAAGCCCCGAAAGGAAGTTCGAGTTGGCTGCTGCCACC-3' and 5'-GGTGGCAGCAGCCAACTCGAGTTCCTTTCCGGGCTTTGTT-3'). Then, human Ku80 coding sequence (corresponded to NP_066964.1) was amplified from a pCDNA3_Ku80_3xFLAG vector (described in Ref. [49]) with primers Ku80-N-BamHI (5'-GGATCCTTAAAGAGGAATTATAATGGTGCAGTCCGGGGAATAA-3') and Ku80-C-XhoI (5'-CTCGAGTTATATCATGTCCAATAAATCGTCCAC-3') and cloned between BamHI and XhoI restriction sites into the vector pET15b-Ku70, obtained at the previous step. The primer Ku80-N-BamHI introduced the Shine-Dalgarno sequence GAGG, the intercistronic sequence AATT, and a stop codon at the 3'-end of the Ku70 gene after the ligation of the PCR product into the vector for the optimal translation efficiency of the Ku80 gene located with -1nt shift relative to the stop codon of the Ku70 gene [50].

To obtain the sequence coding the human HEXIM1 protein, total RNA from HEK 293T cells was extracted by TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's protocol and cDNA was synthesized using the MMLV kit (Evrogen, Russia). Then, the HEXIM1 coding sequence (corresponded to NP_006451.1) was amplified from cDNA by PCR using primers 5'-ACTTCGAGGACTCTACTAGCC-3' and 5'-GTTTCAGTCTAGTCTCCAACCTTGG-3' and verified by Sanger sequencing. For the construction of the GST-HEXIM1 expression vector (pGEX-6p-1-hHEXIM1), HEXIM1 coding sequence was amplified using primers HEXIM1-N-BglII (5'-ATGCAGATCTATGGCCGAGCCATCTTG-3') and HEXIM1-C-XhoI (5'-ATGCCTCGAGTTACTAGTCTCCAACCTTGGAAAGCGG-3') and cloned into the pGEX-6p-1 vector between BglII and XhoI restriction sites in frame with GST tag. The vector for mammalian expression of human HEXIM1 protein (pCDNA3_HEXIM1_3xFLAG) was obtained by cloning the HEXIM1 coding sequence into the AflIII restriction site after the Ku70 gene was cut out of pCDNA3_Ku70_3xFLAG (used in Ref. [49]) by the AflIII restriction enzyme.

pNTap-CTIP2 and RFP-CTIP2 plasmids were described previously [51].

2.2. Expression and purification of recombinant proteins

For recombinant human His6-Ku70/Ku80 production, *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus/pLysS strain was transformed with plasmid pET15b_His6_Ku70(-1 nt)_Ku80, grown in 2 L of modified 2 YT medium (16 g/L bactotryptone, 10 g/L yeast extract, 1 g/L K₂HPO₄, 1.5 g/L NaH₂PO₄, 1% glycerol, pH 7.5) in the presence of 100 mg/L ampicillin (Sigma, USA) at 37 °C until the culture reached OD₆₀₀ = 0.6. Recombinant protein expression was induced by adding IPTG water solution up to 0.1 mM, and bacteria were cultured at 18 °C. After 6 h of cultivation, lactose in the concentration of up to 5 g/l was added. The total cultivation time was 20 h at 18 °C. Cells were harvested by centrifugation (20 min, 4 °C, 4000 g), and 50 g of cellular debris was resuspended in 1 L of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 3 mM 2-mercaptoethanol, 1 M NaCl, 5% sucrose, 0.05% TritonX-100, 2 mM PMSF) with 1 g/L lysozyme and incubated on ice for 30 min. After sonication, the insoluble material was removed by centrifugation (40 min, 4 °C, 35000 g), the supernatant was purified from bacterial DNA by incubation with 0.05% polyethylenimine (pH 5.0) on ice for 30 min, and centrifuged 45 min, 4 °C, 35000 g. The lysate was loaded on Ni-NTA-agarose beads (Thermo Fisher Scientific, USA), and incubated overnight at 4 °C. After binding, the resin was washed with a buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 M NaCl, 5% glycerol, 0.05% TritonX-100, 1 mM PMSF), and a buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 M NaCl, 5% glycerol, 50 mM imidazole, 1 mM PMSF) and finally eluted with a buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 M NaCl, 10% glycerol, 500 mM imidazole, 1 mM PMSF). The fraction of the eluted protein was diluted by 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 up to 50 mM NaCl concentration and then

loaded on the heparin-sepharose (GE Healthcare, USA), washed with a buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 1 mM PMSF, 50 mM NaCl), and eluted with this buffer containing 400 mM NaCl.

For recombinant human HEXIM1 production, *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus/pLysS strain was transformed with plasmid pGEX-6p-1-h-HEXIM1, grown in 2 L of 2% LB medium in the presence of 100 mg/L ampicillin (Sigma, USA) at 37 °C until the culture reached OD₆₀₀ = 0.6. Recombinant protein expression was induced by adding IPTG up to 0.1 mM and bacteria were cultured at 25 °C for 3 h. Cells were harvested by centrifugation (20 min, 4 °C, 4000 g) and resuspended in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.5 M NaCl, 0.1% TritonX-100, 0.1 mM PMSF) containing 1 g/L lysozyme, and incubated on ice for 30 min. After sonication, the insoluble material was removed by centrifugation (40 min, 4 °C, 35000 g), and the lysate was loaded on Pierce®Glutathione Agarose (Thermo Fisher Scientific, USA). After overnight incubation at 4 °C, the resin was washed with 50 mL of lysis buffer and 50 mL volumes of a wash buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.25 M NaCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 5% glycerol, 0.1 mM EDTA). The protein was eluted with 1 ml of the wash buffer containing 50 mM glutathione and was dialyzed against the wash buffer using SnakeSkin Dialysis Tubing (Thermo Fisher Scientific, USA) overnight.

Protein concentrations were measured by Bradford assay (Thermo Fisher Scientific, USA) using BSA (Thermo Fisher Scientific, USA) as a protein standard.

2.3. Western blot

Protein samples were separated using 10% SDS PAGE and analyzed by western blot with anti-His6 antibodies (produced in mouse, SAB1305538, Sigma, USA), anti-Ku70 rabbit polyclonal antibody (ab83502, Abcam, USA), anti-Ku80 rabbit polyclonal antibody (#2735, Cell Signaling, USA), HRP-conjugated anti-rabbit (produced in mouse, A6154, Sigma, USA) and anti-mouse antibodies (produced in goat, A9044, Sigma, USA) were used as secondary antibodies. Visualization of specific protein bands was performed with Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad, USA) using ChemiDoc MP system (Biorad, USA).

2.4. Mass-spectrometry

The protein samples were prepared for MS identification and analyzed as described [52]. Mass-spectra were obtained on UltrafleXtreme Bruker Daltonics MALDI-TOF mass-spectrometer, analyzed by FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Germany), protein identification was performed using Mascot (www.matrixscience.com) (Table S1).

2.5. ³²P-labeled nucleic acid preparation

All oligonucleotides were synthesized using the phosphoramidite method on a Mermaid 12 synthesizer (Bioautomation, USA) by the standard operating procedures using commercially available reagents (Glen Research, USA). Oligonucleotides were double purified by denaturing PAGE, and RP-HPLC and their purity was confirmed by LC-MS. Purified DNA and RNA ligands were labeled with T4 polynucleotide kinase (Thermo Fisher Scientific, USA) and 50 µCi [γ-³²P]-ATP (3000 Ci/mmol) for 30 min at 37 °C. T4 polynucleotide kinase was inactivated by the addition of EDTA followed by phenol-chloroform extraction. The resulting ligands were purified from unincorporated [γ-³²P]-ATP by 15% denaturing PAGE.

2.6. *In vitro* transcription

In vitro transcription was performed using MEGAscript™ T7 Transcription kit (Thermo Fisher Scientific, USA) as recommended by the manufacturer with minor modifications: reaction mixture contained additional 9 mM guanosine for subsequent ³²P labeling of 5' end of RNA. Primers 5'-TAATACGACTCACTA-TAGGATGTGAGGGCGATCTG-3', containing the sequence of T7 promoter, and 5'-AAAGAAAGGCAGACTGCC-3' were used for the amplification by PCR of 7SK template for *in vitro* transcription. The sequence of human 7SK snRNA (332 bases long, RefSeq NR_001445) was prepared from HEK 293T cells genome by PCR using primers 5'-CACCAATGGAGACTGCAGTATTAGCA-3' and 5'-GCATCTAAGTAGATGGGTAATGGGTCAAAG-3'.

2.7. Nucleic acid binding assays

For electrophoretic mobility shift assays (EMSAs), ³²P-labeled nucleic acids (0.1 nM) were annealed and then incubated with increasing concentrations of Ku protein (0–600 nM) in 20 µL of a buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 3% glycerol, 5 µg/ml yeast tRNA, 0.1 mg/ml BSA) for 20 min at room temperature (RT) and subsequently for 10 min on ice. Then, the resulting complexes were separated using 5% pre-run native PAGE at 4 °C for 3 h at 60 V in 1xTBE buffer and visualized by autoradiography (³²P). For the super-shift assay, the reaction mixture containing 0.1 nM ³²P-labeled TAR RNA and 50 nM Ku protein was supplemented with 1 µL of either anti-Ku70, anti-Ku80, anti-His6, and anti-actin (A2103, Sigma) antibody and incubated for 30 min at RT.

For competition experiments, a double-stranded 40-mer DNA duplex with the sense sequence 5'-GACTACGGTCAAGT-CAGCGTGTGAAAATCTCTAGCAGT-3' was used. ³²P-labeled 0.1 nM hp1RNA was incubated with 100 nM Ku protein in the reaction buffer in the presence of increasing concentrations of the unlabeled DNA duplex (0, 0.1, 1, 10, 25, 50, 100, 1000 nM) for 20 min at RT. For the RNA displacement from its complex with Ku by the unlabeled DNA, ³²P-labeled 0.1 nM hp1RNA was pre-incubated with 100 nM Ku protein in the reaction buffer for 20 min at RT, followed by the addition of increasing amounts of the DNA and incubation for 20 min more.

To analyze binding of human full-length 7SK snRNA and recombinant Ku protein, 7SK snRNA was *in vitro* transcribed and 5'-end ³²P-labeled by [γ -³²P]-ATP and T4 polynucleotide kinase. Then, 5 nM 7SK snRNA was incubated with increasing concentrations of recombinant Ku protein (0–400 nM) in the reaction buffer for 20 min at RT followed by separation in the native PAGE.

Typhoon FLA9500 Phosphorimager (GE Healthcare, USA) was used for gel visualization and quantification. The dissociation constants were determined through an approximation of experimental data using a standard equation for bimolecular ligand-receptor binding. Chart preparation and analysis of experimental data were performed using GraphPad Prism 7.03 software.

2.8. RNase T1 footprinting assay

200 nM recombinant Ku protein was incubated with 10 nM T7-transcribed 5'-³²P-labeled full-length 7SK snRNA in 200 µL of a buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 3% glycerol, 5 µg/ml yeast tRNA, 0.1 mg/ml BSA) for 20 min at room temperature. Then, samples containing either 7SK-Ku complex or only free 7SK snRNA were treated with 0.005 U RNase T1 (Thermo Fisher Scientific, USA) per 1 µL of the reaction mixture for 5 min at 37 °C. RNase T1 digestion was stopped by adding phenol-chloroform and subsequent RNA-extraction and precipitation with

ethanol in the presence of glycogen (5 µg). Reaction products were suspended in a loading buffer (80% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol, 1xTBE) and separated on 6%–10% and 10%–15% polyacrylamide denaturing gels.

2.9. Cell culture

HEK 293T cells and microglial cells were cultured at 37 °C and 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 100 I.U./mL penicillin/100 µg/mL streptomycin solution (all from Thermo Fisher Scientific, USA).

2.10. Immunoprecipitation assay

For RNA-immunoprecipitation assay, HEK 293T cells in a 100-mm dish were transfected with 30 µg of the empty pCDNA3.1 vector (negative control) by calcium phosphate or co-transfected with 15 µg of pCDNA3_Ku70_3xFLAG and 15 µg of pCDNA3_Ku80_3xFLAG vectors described earlier [49]. 48 h after transfection, the cells were lysed for 30 min on ice in a lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.05% Triton-X100, 0.1% Tween20, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF), supplemented with Protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, USA) and RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, USA). Extracts were cleared by centrifugation for 10 min at 14,000 g, and protein concentration was measured on NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). 0.1 mg of cell lysates were saved for input analysis. 1 mg of total protein was mixed with FLAG-antibody conjugated agarose (Sigma) and incubated overnight at 4 °C. Beads were washed 5 times with lysis buffer for 10 min at 4 °C, and bound protein complexes were eluted with 0.1 M glycine pH 2.5 for 20 min at room temperature. Elution fractions and inputs were divided for Western blot analysis and RNA extraction by TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized using the MMLV kit (Evrogen, Russia), and qPCR was performed with primers for human 7SK snRNA (5'-GTCAAGGGTA-TACGAGTAGCTG-3' and 5'-TGACTACCTACGTTCTCTAC-3'), for human U6 RNA (5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3' and 5'-AAAA-TATGGAACGCTTCACGA-3') using the qPCR Mix-HS SYBR (Evrogen, Russia) on a Biorad CFX96 amplifier (Biorad, USA).

For co-immunoprecipitation following harvest, cells were lysed for 30 min on ice in the lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.05% Triton-X100, 0.1% Tween20, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF), supplemented with Protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, USA). After centrifugation 15 min 14000 rpm, the protein amount in the extract was quantified by Bradford assay. Antibodies anti-Cdk9 (sc13130, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-HEXIM1 (ab25388, Abcam, USA), anti-Ku80 (ab119935, Abcam, USA), and rabbit IgG isotype control (Thermo Fisher Scientific, USA) as a negative control were incubated with Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific, USA) for 3 h at 4 °C, after that 1 mg of total extract per immunoprecipitation was added for overnight incubation. After several washes with IPLS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 120 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP40, 10% glycerol) and IPHS buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP40, 10% glycerol) proteins were eluted by Laemmli sample buffer (Biorad, USA) and analyzed by Western blot.

For HEXIM1-FLAG immunoprecipitation, HEK 293T cells in 100 mm dish were transfected with either 30 µg of the empty pCDNA3.1 vector (negative control) or pCDNA3.1_HEXIM1_3xFLAG by calcium phosphate. 48 h after transfection, the cells were lysed for 30 min on ice in the lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.05% Triton-X100,

0.1% Tween20, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF), supplemented with Protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, USA). Extracts were cleared by centrifugation for 10 min at 14000 rpm, and protein concentration was measured using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). 0.1 mg of cell lysates were saved for input analysis. 1 mg of total protein was mixed with FLAG-antibody conjugated agarose (Sigma, USA) and incubated overnight at 4 °C. Beads were washed 5 times with the lysis buffer for 10 min at 4 °C and then bound protein complexes were eluted by Laemmli sample buffer (Biorad, USA) and analyzed by Western blot.

For RNase treatment, prior to addition of antibody-bound Dynabeads Protein G or FLAG-antibody conjugated agarose to a cellular extract, it was incubated in the presence or absence of RNase A at 250 U/ml and RNase T1 at 1000 U/ml for 10 min at 37 °C and subjected to immunoprecipitation as above.

For CTIP2 immunoprecipitation with 3FLAG-Ku70, cells cultured in 150-mm diameter dishes were transfected using a calcium phosphate co-precipitation method with the plasmids indicated. Lysates were prepared two days post-transfection as previously described [47]. Immunoprecipitations were performed using the standard technique, as in Ref. [47]. Finally, the immunoprecipitated complexes were processed for SDS-PAGE and immunoblot analysis. Proteins were visualized by chemiluminescence using the Super Signal Chemiluminescence Detection System (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.11. Bioinformatics analysis

The eCLIP data were obtained from the ENCODE database. The data of experiments ENCSR571ROL and ENCSR258QKO, obtained for HepG2 and K562 lines, were used respectively. Detailed protocols of experiments and data processing are available on the pages of experiments (<https://www.encodeproject.org/experiments/ENCSR571ROL/> and <https://www.encodeproject.org/experiments/ENCSR258QKO/>). Uniquely mapped reads were used for reads coverage counting. Files were downloaded in “bed” format containing the coordinates of the RNA binding sites in the human genome (version GRCh38). For every site values of the normalized coverage (eCLIP signal) and p-value were given. Peaks were filtered by thresholds to a signal level of at least 6.3 and p-value no more than 0.01. For further analysis, only the peaks present in both biological replicates were used and the average coverage was calculated. If the partially overlapping sites, the sequences occurring in one replicate was selected, and the average coverage for the common fragment was counted.

For analysis we used the following software: RNAstructure for RNA secondary structure prediction [53], RNAforester from ViennaRNA Package 2.0 with parameter -r for RNA secondary structure similarity calculation [54], LocARNA for consensus RNA structure prediction [55]. Preferable for Ku binding consensus RNA structure was build using our tested RNAs (TAR, hp1RNA, let7a) and published structure from p53 mRNA [6] and human telomerase RNA [18]. Also, we included GpG sequence into consensus structure since UGGG > CAAA substitution in the terminal loop of TAR RNA decreased its binding with Ku.

2.12. Confocal microscopy

Microglial cells were cultivated on glass coverslips in a 24-well plate and transfected with Jetprime® (polyplus transfection) according to the manufacturer's protocol. 48-hours post-transfection, cells were fixed with PFA 4% and permeabilized with PFA 4%/Triton 1%. The cells were incubated in BSA blocking buffer, then incubated for 1 h with primary mouse anti-Ku70 antibodies (Abcam 3114)

followed by a 1-h incubation with Alexa 647-labeled anti-mouse antibodies. Finally, the cells were incubated for 30 min with Hoechst to stain the cell nucleus. The cells were washed with PBS after each step. Fluorescence was recorded by confocal microscopy using a Zeiss laser scanning microscope (model 510 invert) equipped with a Planapo oil (63x) immersion lens (numerical aperture = 1.4).

3. Results

3.1. Expression and purification of recombinant Ku protein

The Ku protein usually used for *in vitro* studies is either an endogenous protein purified from mammalian cells or a protein produced in the baculovirus system [56,57]. Both approaches to Ku production are multi-step and result in relatively low yields and high costs. Purification from *E.coli* cells is mainly used only for truncated Ku proteins [58,59]. Earlier, we designed a method for a recombinant Ku70 subunit production, taking advantages of two-tags (His6-and GST-) protein purification [48,49], and here tried to apply this method to Ku80 production. However, the expression of Ku80 in *E. coli* resulted in its significant proteolysis and insolubility (data not shown). Therefore, we used an approach described earlier [60] for bi-cistronic expression of Ku70 and Ku80 subunits from the single T7 promoter with some modifications. We constructed a plasmid vector containing the Ku70 (XRCC6) coding sequence followed by the Ku80 (XRCC5) coding sequence. To increase the translation efficiency from the second cistron, we used an approach described in Ref. [50]: Ku80 sequence had an internal Shine-Dalgarno sequence in the open reading frame of Ku70 sequence and started with a -1nt shift related to Ku70 open reading frame (Fig. 1A).

Recombinant Ku protein bearing a His6-tag at the N-terminus of Ku70 subunit was expressed in *E.coli* BL21(DE3) Codon Plus/pLysS, and purified by two consecutive chromatography procedures. However, the protein prepared along with a full-size Ku70 (MW ~ 75 kDa) and Ku80 (MW ~ 90 kDa) subunits contained one major Ku80 proteolysis product (MW ~ 65 kDa) (40% according to Western blot) (Fig. 1B). Nonetheless, the final yield of the full-length Ku70/Ku80 was estimated at 0.45 mg/L, which is comparable to that described previously [60]. The first N-terminal peptide resulted from trypsin digestion of the Ku80 proteolysis product, according to mass-spectrometry analysis, was ²¹⁰MVMISLEGEDGLDEIYSFSESRLR²³² (Table S1). We supposed that it is C-terminal fragment of Ku80 with an approximate length of 523 amino acids. The truncated Ku80 lacked a major part of the N-terminal alpha-helix/beta-barrel von Willebrand A (vWA) domain, which participates in neither DNA nor Ku70 binding [61,62]. This explains the ability of the truncated Ku80 to form a stable complex with Ku70 during both purification steps.

The main function of Ku protein is recognition of DNA ends during double-stranded DNA break repair via NHEJ pathway [1,4,5]. The minimal length of DNA duplexes sufficient for Ku binding is about 14–20-mer, and this binding is not sequence-specific [61–63]. To examine the functional quality of the prepared recombinant Ku protein, we tested its DNA-binding capacity using an electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Briefly, a³²P-labeled 21-mer or 40-mer DNA duplex was incubated with increasing concentrations of the recombinant Ku protein, and then the mixture was resolved on a nondenaturing polyacrylamide gel. As shown in (Fig. 1C), Ku was able to form stable complexes with both DNA ligands; determined K_d values were 0.9 ± 0.3 nM and 0.5 ± 0.2 nM for 21-mer and 40-mer DNA duplexes, respectively, and correlated with published data [64]. As it was described earlier [60,62,64], we detected two lower migrating bands in the case of

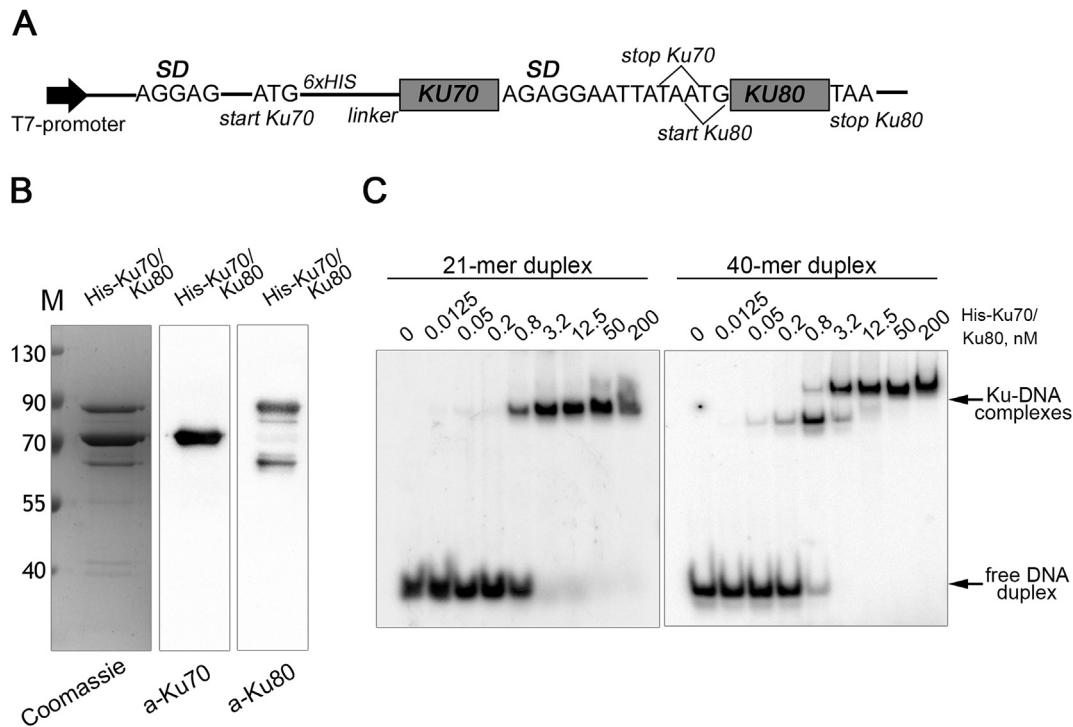


Fig. 1. Expression, purification, and DNA binding characteristics of the Ku heterodimer prepared in *E. coli*. **A.** Scheme of the expression vector fragment coding for the Ku protein subunits. **B.** Recombinant N-His6-Ku70/Ku80 protein after two-step purification on Ni-NTA-agarose and heparin-sepharose analyzed by SDS PAGE with subsequent Coomassie blue staining (lane 1), and Western blot with anti-Ku70 (lane 2) and anti-Ku80 (lane 3) antibodies. M - molecular mass markers in kDa. **C.** Gel-shift analysis of 0.1 nM DNA binding with increasing concentrations of recombinant N-His6-Ku70/Ku80. Protein concentrations are indicated above the gel.

40-mer DNA, probably, corresponding to complexes with DNA:Ku ratio equal to 1:1 and 1:2, since the latter appeared only at increased Ku concentrations. The 21-mer duplex formed with Ku only one complex, since the duplex length was evidently insufficient for binding two Ku heterodimers.

3.2. Ku protein binds RNA with a stem-loop structure in vitro

Having confirmed that the purified recombinant Ku can bind dsDNA, we next studied its RNA binding capacity by EMSA using a set of 32 P-labeled RNA ligands (Table 1). No interaction between the Ku heterodimer and a 21-mer double-stranded RNA (dsRNA) was observed (Fig. 2A, Table 1). Ku purified from HeLa cells is known to interact with HIV-1 TAR RNA [41], which has a hairpin structure with a 3-nt bulge just near the terminal loop. We analyzed the recombinant Ku binding with TAR RNA and found that incubation of the protein with the RNA resulted in a new band with reduced electrophoretic mobility (Fig. 2A). To verify the nature of the complex, the binding was performed in the presence of anti-Ku80, anti-Ku70, and anti-His6 antibodies (supershift assay). In all cases, the appearance of a new high-mass band was observed, thus confirming the RNA-protein complex is composed of Ku70 and Ku80 (Fig. 2B). Thus, we confirmed that our recombinant Ku formed a stable complex with TAR RNA (Table 1). At high protein concentrations, the second RNA-protein complex was detected suggesting binding of two Ku molecules to the ligand as it was demonstrated for Ku-DNA interactions. Earlier, we showed that the human Ku70 subunit purified from *E. coli* interacted with RNA only in the absence of Mg^{2+} [48]. Due to an excess of the Ku70 subunit in the purified heterodimer, we performed Ku-TAR RNA binding in the presence and absence of Mg^{2+} to distinguish between Ku70-RNA and heterodimer Ku-RNA complex formation. No difference in the K_d values was determined in both experiments that confirmed the

preferable formation of the heterodimer Ku-RNA complex. Further experiments were carried out in the absence of Mg^{2+} cations to minimize RNA degradation.

We also analyzed Ku interactions with two RNA hairpins derived from TAR RNA: TAR-M1 hairpin lacking a bulge, and TAR-M2 with UGGG > CAAA substitutions in the terminal loop. The latter decreased the RNA binding by Ku purified from HeLa cells [41]. Changing the loop sequence decreased the affinity of the recombinant Ku protein to TAR RNA as well; however, the decrease was not as strong as in the case of the bulge deletion, which led to an approximately 3-fold drop in K_d (Table 1).

Next, we examined Ku binding with several RNA hairpins of various structures (Fig. 2D, Table 1). Among them, hp1RNA, resembling TAR with the bulged stem-loop structure but without sequence similarity, was bound the most efficiently. The Ku affinity to RNAs without bulges, hp2RNA and microRNA mir-504, was comparable with that to TAR-M1. Interestingly, Ku binding to another microRNA, hsa-let-7a-2, containing a bulky bulge just near the loop was somewhat less efficient than to TAR and hp1RNA. This allowed assuming that the bulge in hsa-let-7a-2 was probably too bulky and created some steric tension when binding to Ku.

Under investigation of Ku interactions with human telomerase RNA [18] or p53 mRNA [6], it was found that endogenous Ku from HeLa cells efficiently bound a bulged hairpin structure in both RNAs. The p53 mRNA hairpin contained two consecutive bulges; the first one contained two nucleotides and was located just near the loop, and the second one was a large bulge composed of 8 nucleotides and located downstream the stem. Importantly, only the deletion of the first bulge led to the disruption of the Ku-RNA complex. Noteworthy, altogether our and literature data demonstrate the importance of the stem-loop RNA structure containing a bulge close to the loop for its recognition by the human Ku protein, and this is consistent with observations made with the yeast Ku protein [16].

Table 1

Structures of DNA and RNA molecules used in the study and stability of their complexes with the recombinant Ku protein.

Name	Structure	K_d , nM ^a
21-mer DNA	5'-gtgtggaaaatctctagcagt-3' 3'-cacaccttttagagatcgtca-5'	0.9 ± 0.3
40-mer DNA	5'-gactacgggttcaagtcagcgtgtggaaaatctctagcagt-3' 3'-ctgatgccaagttcagtcgcacaccttttagagatcgtca-5'	0.5 ± 0.2
dsRNA	5'-aucaucaaaaccguuuuagc-3' 3'-uaguaguuuuggcaaaucg-5'	NB
dsRNA-bulge	5'-guugugcucc ucuacgagc-3' 3'-caacacgagg _{acc} agaugcgcag-5'	NB
TAR	5'-cugguuag ^a ccaga ^u c ^u gagc ^c u ^g 3'-gaucaauc ^g gucuc ^c ucg ^a g ^g	54 ± 6
TAR-M1	5'-cugguuag ^a ccagagagc ^c u ^g 3'-gaucaauc ^g gucucucg ^a g ^g	145 ± 17
TAR-M2	5'-cugguuag ^a ccaga ^u c ^u gagc ^c c ^a 3'-gaucaauc ^g gucuc ^c ucg ^a a ^a	85 ± 16
hp1RNA	5'-ggcgucc ^c uc ^c ccga ^a gc ^u g ^c 3'-cc ^a gcagg ^a ac ^a ggcu ^c gc ^g	45 ± 10
hp2RNA	5'-guccuc ^a ccccacc ^c uc ^u g ^a 3'-cagggag ^c gggugg ^a acc ^c u ^a	125 ± 20
let7a	5'-cg ^a auc ^c uccgatauguca ^a uag ^a g ^g 3'-gg ^u ag ^u agg ^u uuguauag ^u u ^a uc ^a ag ^a	70 ± 7
mir-504	5'-gagaccug ^g ucugcacucu ^a uc ^u gua ^u u ^u 3'-cuuugggac ^g ggacgugagg ^a g ^u cau ^u c ^c	115 ± 11

NB – No binding detected.

^a The mean of at least three independent experiments with standard deviations.

To test whether the existence of a bulge is a structural motif sufficient for RNA recognition by human Ku, we constructed an RNA duplex (dsRNA-bulge) containing a 4-nucleotide bulge. A complex between dsRNA-bulge and recombinant Ku turned out to be detected only at the highest protein concentration (400 nM) (Fig. 2A). Thus, we could conclude that an unpaired region in the duplex is not enough for successful RNA recognition by Ku, and therefore, the RNA structure motif necessary for the efficient Ku binding is a hairpin with a bulge located near the loop.

To determine a region within heterodimeric Ku responsible for its interactions with a hairpin RNA, we used a competitor approach and carried out the binding assay in two variants. First, ³²P-labeled hp1RNA was incubated with Ku in the presence of increasing concentrations of an unlabeled double-stranded DNA competitor. Second, the competitor was added to a pre-formed complex of ³²P-labeled hp1RNA and Ku. In both cases, the dsDNA successfully interrupted the complex formation suggesting the same binding site for dsDNA and RNA hairpin (Fig. 2C). These data are consistent with observations made with Ku purified from mammalian cells [33].

3.3. In silico secondary structure analysis of RNAs interacting with Ku70 in cell culture

To determine RNA structures interacting with Ku protein in cells,

we used eCLIP (enhanced crosslinking and immunoprecipitation) data available from the ENCODE database. This method allows the identification of protein binding sites within cellular RNAs and the estimation of enrichment values for the precipitated RNAs [65]. The ENCODE database contains the results of eCLIP experiments for HepG2 and K562 cell lines. Precipitation of cross-linked RNA-Ku complexes was carried out using antibodies to Ku70, in cells Ku70 is tightly associated with Ku80, and the identified RNAs were most likely bound to the Ku heterodimer. The data were obtained in a processed form and represented positions of the protein binding sites in the precipitated RNAs and peak intensity values. The intensity of the peaks was calculated as reads coverage of the protein binding site in RNAs in the eCLIP library, normalized to reads coverage of the site in the transcriptome library. Importantly, these data can be used not only to detect all RNAs associated with the protein but also to identify specific regions of RNA, which are recognized and bound to the protein.

The analysis of the eCLIP data revealed several transcripts that have at least one region bound by Ku70 and longer 10 bases (28 RNA regions listed in Table S2). The set of these transcripts differed between two cell lines, only 2 transcripts were identified in HepG2 line, and 14 transcripts in K562 line. To clarify whether there is a specific RNA motif recognized by Ku70, we analyzed structures of the identified RNA regions (N = 28). For each region, a secondary

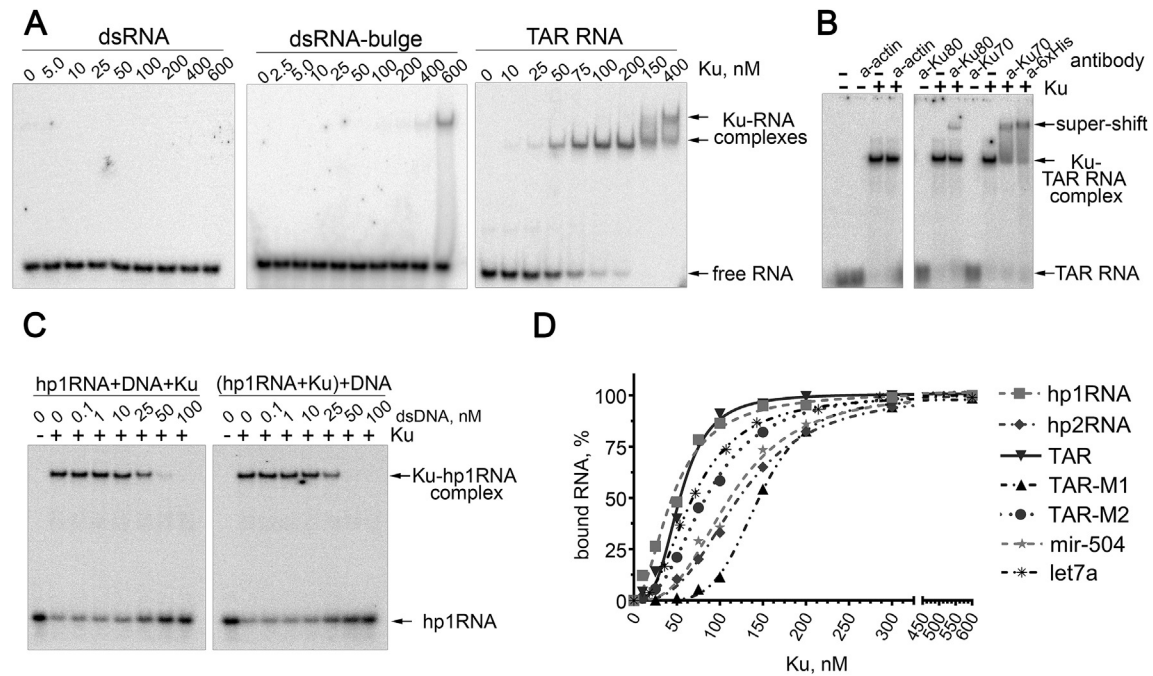


Fig. 2. Binding of the recombinant Ku protein to ^{32}P -labeled RNA ligands tested by EMSA. **A.** Binding of 0.1 nM double-stranded RNA (dsRNA), bulged double-stranded RNA (dsRNA-bulge) and TAR RNA with increasing concentrations of the protein. Positions of free and Ku-bound RNAs are indicated by arrows. **B.** Complex formation between Ku and TAR RNA in the presence of anti-actin (negative control), anti-Ku80, anti-Ku70, or anti-His6 antibodies. Positions of free and Ku-bound RNAs and super-shift of the Ku-RNA complex by an antibody are indicated by arrows. **C.** Binding of 0.1 nM ^{32}P -labeled hp1RNA with Ku in the presence of increasing concentrations of unlabeled DNA competitor (left gel), and displacement of ^{32}P -labeled hp1RNA from its pre-formed complex with Ku by increasing concentrations of unlabeled DNA (right gel). **D.** Curves of RNA binding with increasing concentrations of Ku based on the gel-shift assay. Points represent the mean of at least three independent experiments.

structure was predicted using RNAstructure software [53]. At first sight, the predicted structures looked rather unlike each other and had nothing in common. Of note, the secondary structure of some of them resembled those of HIV-1 TAR RNA and hp1RNA as well as a consensus RNA hairpin preferable for the yeast Ku binding [16]. Also, we noticed that some identified RNAs had G-rich sequences, in particular, GpG dinucleotide, in the terminal loop. The presence of this sequence was found to be important for the Ku binding since mutations UGGG- > CAAA in the TAR RNA loop slightly decreased its binding to Ku (Table 1).

Since RNAs had different signals in eCLIP, we assumed that the value of the eCLIP signal should depend on the RNA structure. To verify this assumption, we constructed a consensus RNA structure on the base of RNAs validated in our experiments as well as in the literature (Fig. 3A), and then we aligned structures of the identified RNAs with it. Using the alignment, the degree of similarity between the identified RNA fragments and the consensus structure was calculated. The similarity to the consensus structure was found to correlate positively with the magnitude of the eCLIP signal. The greatest correlation was observed taking into account the presence

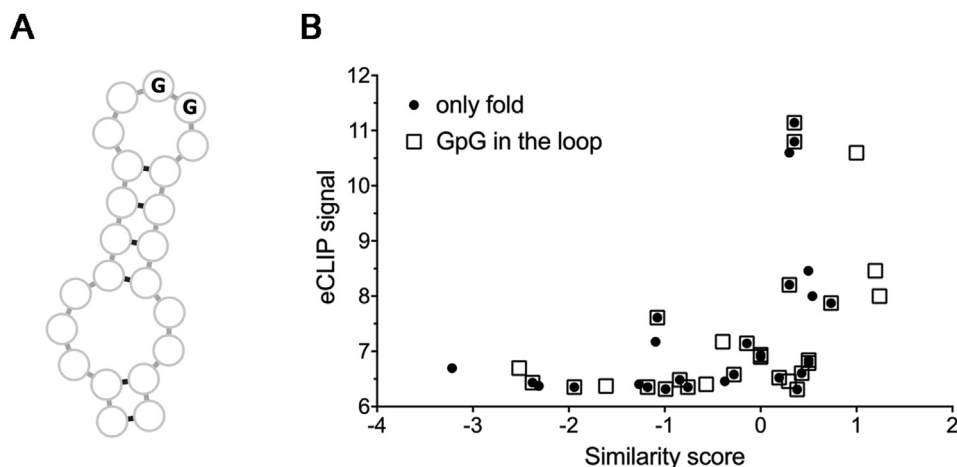


Fig. 3. Analysis of RNA structures preferably bound by Ku in cell cultures. **A.** A consensus structure of RNA preferably bound by Ku. **B.** Dependence of the eCLIP signal of RNA bound by human Ku on its similarity of structure to the consensus structure. For black dots, the similarity was calculated relying on the RNA folding (Spearman correlation coefficient $r = 0.43$, p -value 0.021, $N = 28$); for empty square, the similarity calculation considered the presence of GpG sequence in the loop in addition to the RNA folding (Spearman correlation coefficient $r = 0.48$, p -value = 0.009, $N = 28$).

of the GpG sequence in the loop in the similarity counting (Spearman correlation coefficient $r = 0.48$) (Fig. 3B). Thus, we have shown that the structure of RNA determines the Ku-binding affinity not only *in vitro* but also in cells.

3.4. Ku interacts with 7SK snRNA

TAR RNA, which plays an important role in transcription regulation from the HIV-1 promoter, is known to have some structural similarities with 7SK snRNA [46,66,67]. The latter is a highly structured small nuclear RNA participating in the regulation of transcription elongation by RNAPII [68,69]. Taking into account the high affinity of Ku to TAR RNA, we decided to analyze its capacity to bind 7SK snRNA that forms four hairpins with a stem-loop structure.

The EMSA experiment with the recombinant Ku protein and 32 P-labeled T7-transcribed RNA showed that 7SK snRNA formed a complex with Ku, and K_d value for this complex was estimated as 30 nM (Fig. 4A). To elucidate the Ku-binding site within 7SK snRNA, we used a footprinting assay with RNase T1 digestion. We clearly demonstrated strong protection of G50–G52 and G55 residues

located in the terminal loop of the conserved hairpin 1 (HP1) pointing out to the Ku binding with this bulged stem-loop region (Fig. 4B–C). We also observed the protection of several G-residues in the hairpin 3 (HP3), but it was much slighter than the protection of the G50–G55 region. We cannot rule out some weak interactions of Ku with HP3, but rather Ku being strung on HP1 by its bulk ring-like DNA-binding domain covers the structures lying next to it within the tertiary RNA structure.

Further, we performed the RNA-immunoprecipitation assay to find out interactions of Ku and 7SK snRNA in HEK 293T cells. Briefly, Ku70 and Ku80 tagged by 3xFLAG-peptide were overexpressed and pulled down by anti-FLAG resin, protein-RNAs complexes were washed and eluted, and the RNAs were extracted. Cells transfected with an empty pcDNA3 vector was used as a negative control. The level of the co-precipitated RNAs was estimated by RT-qPCR. We obtained two-fold enrichment of 7SK snRNA but not U6 snRNA, which we used as a control (Fig. 4, D). U6 snRNA is a non-coding small nuclear RNA with a stem-loop structure, however, it contains neither bulge nor terminal G-rich loop [70,71] (Fig. S1). Thus we have first shown that Ku protein is able to bind 7SK snRNA *in vitro* or being over-expressed in HEK 293T cells.

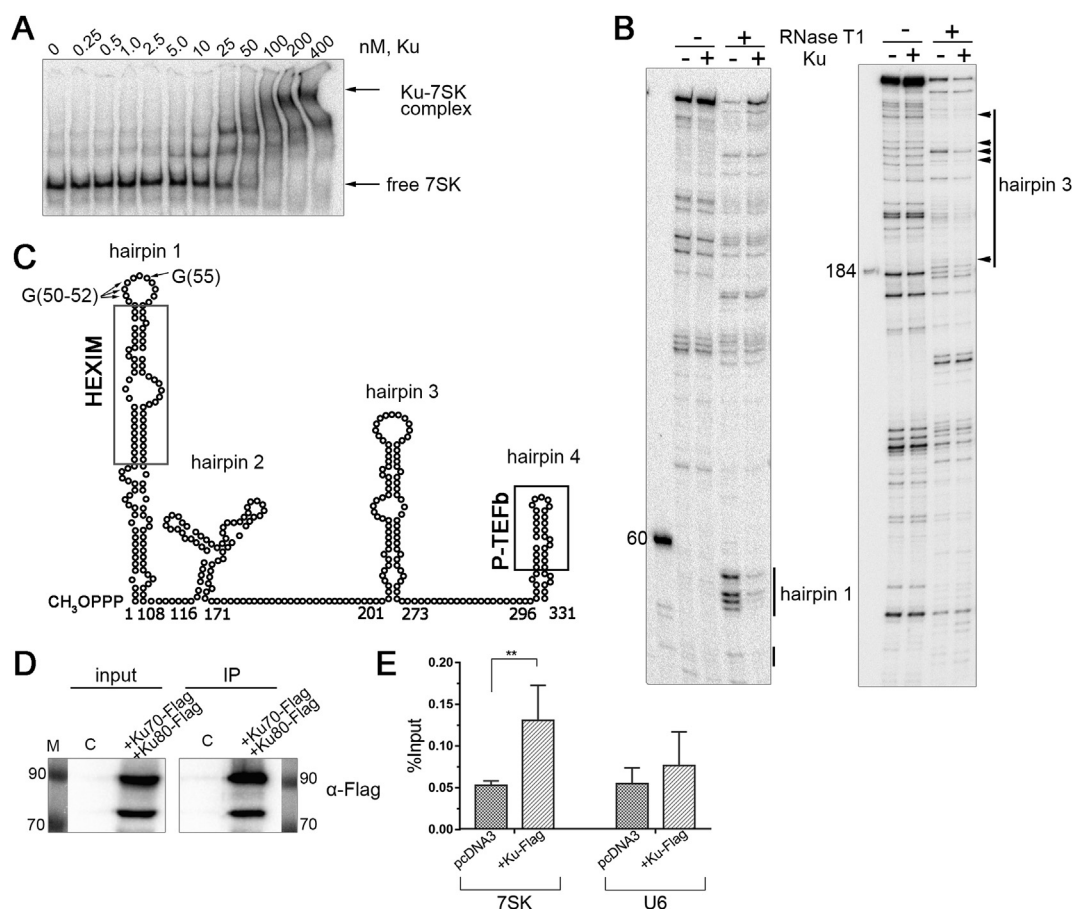


Fig. 4. Ku interacts with 7SK snRNA. **A.** Gel-shift analysis of binding of the 32 P-labeled T7-transcribed 7SK snRNA with increasing concentrations of the recombinant Ku protein. Positions of free and bound 7SK snRNA are indicated by arrows. **B.** Footprinting assay with RNase T1 digestion of the 32 P-labeled T7-transcribed 7SK snRNA in the presence and absence of the recombinant Ku protein. Products of the footprinting assay were resolved by denaturing PAGE (the left gel is 10–15%, and the right gel is 6–10%). 60-mer and 184-mer RNAs were used as mobility controls. Positions of the protected nucleotides are marked by arrows and lines. **C.** Conserved hairpins of 7SK snRNA with binding sites of HEXIM1 and P-TEFb proteins. Indicated G50, G51, G52, and G55 residues were protected by Ku protein in the RNase footprinting assay. **D.** Immunoprecipitation of Ku70-FLAG/Ku80-FLAG from transiently transfected HEK 293T cells using anti-FLAG beads. Western blot of input and precipitated proteins with detection by anti-FLAG antibody. **E.** Level of co-precipitated with Ku70-Flag and Ku80-Flag endogenous 7SK and U6 snRNAs detected by RT-qPCR. Cells transfected with the pcDNA3 vector was used as a control. Data from three independent experiments are presented as mean of percentages of the bound input, error bars represent SD (** $p < 0.01$ as compared with the control according to Student's *t*-test).

3.5. Interactions of Ku with protein components of the 7SK ribonucleoprotein complex

7SK RNA is known to form a scaffold for a ribonucleoprotein complex [45,69]. We analyzed whether Ku can interact with such components of 7SK snRNP as HEXIM1 and Cdk9. For this purpose, we performed immunoprecipitation of these endogenous proteins using specific anti-HEXIM1 or anti-Cdk9 antibodies, and as a result, we observed the Ku80 subunit in the precipitated fraction (Fig. 5A). Moreover, endogenous HEXIM1 and Cdk9 were co-precipitated with endogenous Ku80 using anti-Ku80 antibodies (Fig. 5A). The co-precipitation of the proteins from 7SK snRNP with Ku could be mediated by interactions between Ku and 7SK snRNA. To clarify a possibility of a direct Ku binding to Cdk9, we carried out

immunoprecipitation of endogenous Cdk9 in the presence and absence of RNase cocktail, and subsequently monitored the amounts of co-purified endogenous Ku80 (Fig. 5B). A significant amount of Ku80 was co-precipitated with Cdk9 in an RNase-resistant fashion suggesting direct protein-protein interactions between them.

In the case of HEXIM1, immunoprecipitation of Flag-tagged HEXIM1 was performed from cells transiently transfected with either pcDNA3 or pcDNA3-HEXIM1-3xFLAG vector (Fig. 5C) also with or without RNase treatment. We could detect Ku80-HEXIM1 complex under native conditions, whereas the RNase treatment partially disrupted the complex. To verify if the association of these proteins is indeed RNA-dependent, a recombinant GST-HEXIM1 protein was purified, and interaction of recombinant proteins

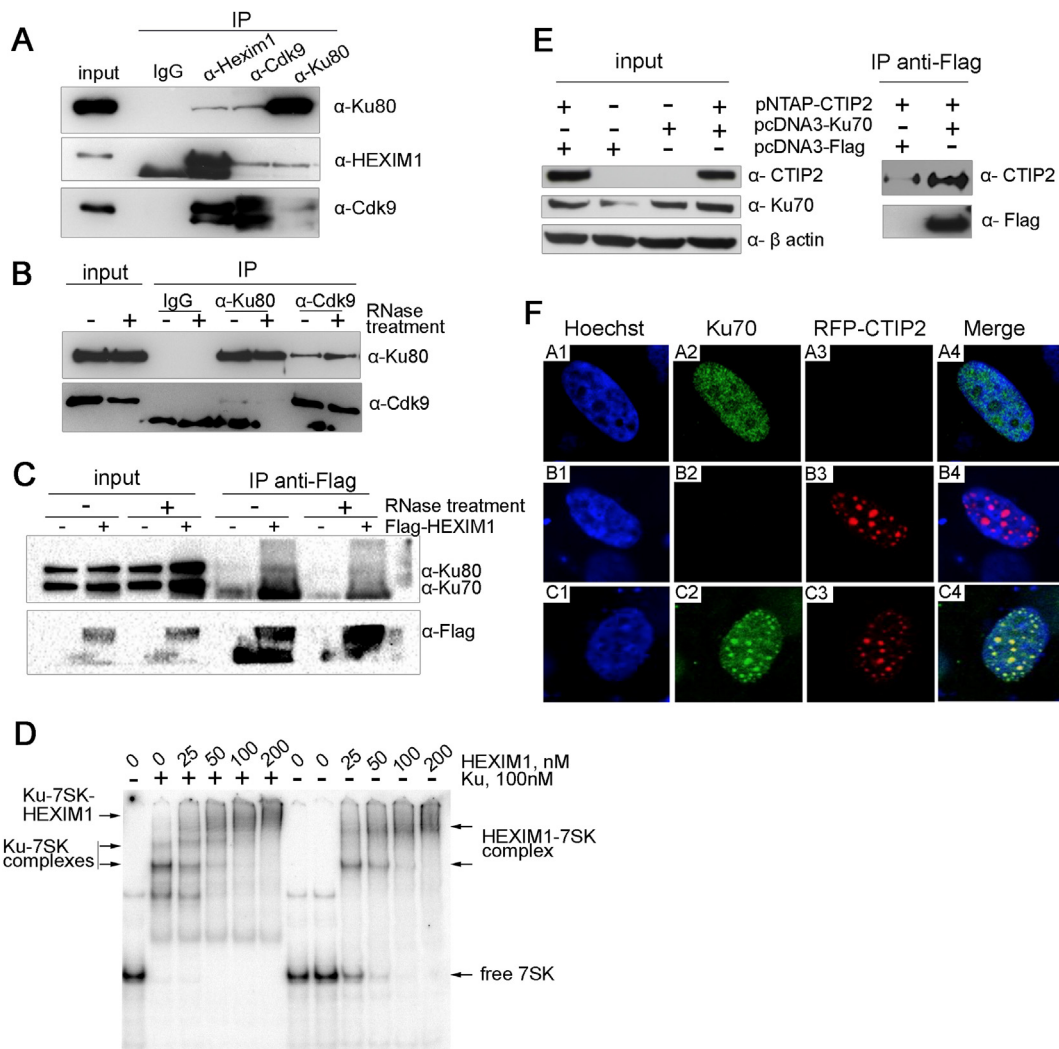


Fig. 5. Ku interacts with protein components of the 7SK snRNP complex. **A.** Immunoprecipitation of endogenous Ku80, HEXIM1, and Cdk9 from HEK 293T cells using specific anti-HEXIM1, anti-Cdk9, and anti-Ku80 antibodies. Input and precipitation steps were monitored for endogenous Ku80, HEXIM1, and Cdk9. Immunoprecipitation with rabbit IgG was used as a control. **B.** Immunoprecipitation of endogenous Ku80 and Cdk9 from HEK 293T cells in the presence (marked by a plus) or absence (marked by a minus) of RNase cocktail. Input and precipitation steps were monitored for endogenous Ku80 and Cdk9. Immunoprecipitation with rabbit IgG was used as a control. **C.** Anti-Flag immunoprecipitation of HEXIM1-FLAG from transiently transfected HEK 293T cells with either control pcDNA3 or pcDNA3-HEXIM1-3xFLAG vector. Prior immunoprecipitation the cellular lysate was incubated in the presence (+) or absence (-) of RNase cocktail. Western blot using anti-Ku80, anti-Ku70, and anti-Flag antibodies. **D.** Gel-shift analysis of binding of the ³²P-labeled T7-transcribed 7SK snRNA with Ku and HEXIM1. Positions of free and bound 7SK snRNA are indicated by arrows. **E.** Nuclear extracts from HEK 293T cells transfected with pNTap-CTIP2 combined to the pcDNA3-Flag or the pcDNA3-Ku70-3xFlag vector were subjected to immunoprecipitations targeting the Flag peptide and analyzed by Western blot for the presence of CTIP2 as described previously [51]. Controls of CTIP2 and Ku70 expressions in nuclear extracts of HEK 293T cells were also accessed by Western blot. **F.** Control microglial cells (lane A) and microglial cells expressing RFP-CTIP2 (Lanes B and C) were subjected to immunostainings with mouse anti-Ku70/Alexa 647-labeled goat anti-mouse IgG (Lane A and C) or with Alexa 647-labeled goat anti-mouse IgG alone (Lane B). Nuclei were stained by Hoechst as indicated. Patterns of CTIP2 and Ku70 expressions were analyzed by confocal microscopy.

His6-Ku70/Ku80 and GST-HEXIM1 was studied in a GST-pull-down assay. We did not detect direct binding of Ku and HEXIM1 in the absence of 7SK snRNA (data not shown). To examine the formation of the ternary complex containing HEXIM1, Ku and 7SK snRNA, we performed an EMSA using labeled T7-transcribed 7SK snRNA and the recombinant proteins (Fig. 5D). In the absence of HEXIM1, we detected two complexes of Ku with full-length 7SK snRNA and a complex probably composed of Ku and degraded RNA. When HEXIM1 was added, bands corresponding to the complexes of Ku with full-length 7SK snRNA disappeared, and the formation of a higher-mass complex was observed. Notably, this complex possessed slightly lower mobility than a binary HEXIM1-RNA complex, suggesting it contained HEXIM1, Ku and RNA. Thus, we can conclude that the association of Ku with HEXIM1 protein occurs via their interactions with 7SK snRNA.

We have previously shown that the cellular repressor CTIP2 associates with 7SK snRNA and HEXIM1 to repress P-TEFb function [47]. Here we analyzed interactions of Ku with CTIP2 by co-immunoprecipitation experiments and confocal microscopy analysis. Co-immunoprecipitation experiments were performed with nuclear extracts from HEK 293T cells expressing CTIP2 and Ku70-Flag. We found that CTIP2 does interact with Ku protein (Fig. 5E). To confirm Ku association with CTIP2 in a cellular context, we next analyzed Ku70 and CTIP2 localization patterns in microglial cells. These cells are considered as the main HIV-1 reservoirs of the central nervous system, and CTIP2 is shown to be a key regulator of HIV-1 gene transcription in microglial cells (reviewed in Ref. [72]). The confocal microscopy analysis of CTIP2 and Ku70 nuclear localization also pointed to the possibility of interactions of these proteins (Fig. 5F). Ku70 harbored a punctate pattern of localization in the nucleus of the cells in the absence of RFP-CTIP2 expression (lane A), whereas upon RFP-CTIP2 expression we observed a clear concentration of the endogenous Ku70 protein in CTIP2-induced structures. As shown by the yellow staining in Fig. 5F (lane C4), RFP-CTIP2 and Ku70 were co-localized in the nucleus. As a specificity control, no green staining was detected with the fluorescent secondary antibody alone (lane B). Altogether, these results suggest that the Ku protein physically interacts with the CTIP2-associated inactive pTEFb complex.

4. Discussion

Accumulating data point out to the importance of Ku-RNAs interactions in eukaryotic cells. There are studies elucidating the functional role of Ku-RNA binding in DSB repair, telomere maintenance, modulation of translation and innate immune response [10–14,21–24,29,33]. However, the mechanism of RNA binding by human Ku heterodimer has not been yet clarified. To figure out the structural aspects of RNA interactions with the human Ku heterodimer, we developed a new system for recombinant Ku production in *E.coli*, and using the purified heterodimer and RNA molecules possessing different structures, we performed EMSA studies. Besides this, we analyzed the results of eCLIP (enhanced crosslinking and immunoprecipitation) experiments available for human Ku from the ENCODE database. The results obtained altogether allowed us to propose a consensus RNA structure favorable for the Ku binding, which is a hairpin containing a bulge within a few nucleotides from the loop and possessing the GpG sequence in the terminal loop (Fig. 3A). The structure proposed resembles consensus RNA preferable for binding with yeast Ku described earlier [16] except for the loop sequence importance for the recognition by the human protein, but not the yeast one.

We also investigated Ku interplay with a highly structured 7SK snRNA, which is a scaffold for a ribonucleoprotein complex participating in transcription regulation [45]. We found that the

recombinant Ku protein and T7-transcribed RNA formed a stable complex with K_d value about 30 nM (Fig. 4A). Also, RNA-immunoprecipitation of transiently expressed FLAG-tagged Ku in HEK 293T cells confirmed the intracellular interaction of 7SK snRNA and Ku protein (Fig. 4C). To better characterize the mode of Ku-7SK RNA interplay, we performed a footprinting assay with RNase T1 digestion, which allowed us to elucidate the Ku-binding site within 7SK snRNA. Despite a complex stem-loop structure of this RNA with a lot of hairpins and stem abnormalities preferable for Ku binding, we detected strong and reliable protection only for G50–G52 and G55 residues located in the terminal loop of a conservative hairpin 1 (HP1) (Fig. 4B). Upon our study of the Ku binding with different RNA structures, we detected the formation of a stable complex between Ku and TAR RNA, which is a bulged hairpin formed at the 5'-end of the nascent transcript of HIV-1. Interestingly, structural similarities of TAR and 7SK RNAs were thoroughly studied, and a structural mimicry was found for TAR and two hairpins of 7SK snRNA, HP1 [46] and HP4 [66]. However, we detected no protection in the HP4; the result that points out to a specific character of the Ku binding to 7SK snRNA.

Of note, HP1 is involved in interactions with the transcription repressor HEXIM1 that binds an inverted GAUC double-strand repeat located near the terminal loop [73,74]. Importantly, in 7SK snRNP, HEXIM1 also interacts with Cdk9, a component of P-TEFb bound with HP4, and inhibits its phosphorylating activity [75,76]. We verified the association of endogenous Ku with these proteins in HEK 293T cells. As for Cdk9, the interaction of Ku70 only with its minor 55 kDa-isoform was previously shown in HeLa cells [77]. In our study, Ku was co-precipitated with the main 42 kDa-isoform of Cdk9, and the binding of these proteins was RNA-independent. HEXIM1 was co-precipitated with Ku as well, however, RNase treatment destroyed HEXIM1-Ku complex (Fig. 4D–F). Moreover, recombinant Ku and HEXIM1 were not able to interact in the absence of 7SK snRNA. Importantly, we detected the formation of a ternary complex containing the recombinant HEXIM1, Ku, and full-length 7SK snRNA (Fig. 4G), although HEXIM1 and Ku bind the same HP1. We can propose two possible explanations of this fact: either HEXIM1 and Ku bind different regions within HP1 and therefore do not interfere with each other, or in the presence of Ku, HEXIM1 interacts with another 7SK snRNA region since it has been found to bind HP3 as well [74]. We have also elucidated the interaction of Ku with another component of 7SK snRNP, namely, the transcriptional repressor CTIP2 that is a major modulator of P-TEFb activity. CTIP2 is known to interact with an inactive P-TEFb complex containing the 7SK snRNA and HEXIM1 [47].

There are numerous studies showing the participation of Ku protein in the transcription regulation of cellular and viral genes [40,78–84], and it is supposed that there is a specific mechanism of Ku-dependent regulation for each particular gene. Among the mechanisms proposed, there is no either involving the interaction of Ku with RNA, but we cannot completely rule out such a possibility. Also, it has been shown that depletion of the Ku protein level affects the efficiency of HIV-1 transcription in infected cells [84–86]. However, the nature of Ku influence has not been elucidated, and no Ku-binding site within the HIV-1 LTR promoter is yet determined [87,88].

5. Conclusions

We have demonstrated that Ku may efficiently bind both TAR and 7SK snRNA that are known to be involved in HIV-1 transcription regulation [42,89,90]. Our data give reasons to hypothesize that Ku protein could be involved at least in the HIV-1 transcription regulation via its interactions with TAR and/or 7SK snRNA as well as protein components of 7SK snRNP. Indeed, we have previously

reported that the cellular repressor CTIP2 binds both the 7SK snRNA HP2 and HEXIM1 to repress P-TEFb function and thereby cellular and HIV-1 genes transcription [47]. Here we further report that Ku binds and colocalizes with CTIP2 in the nucleus. These results confirm Ku association with the inactive P-TEFb complex and suggest the involvement of Ku protein in the regulation of P-TEFb-sensitive genes including HIV-1.

Funding

The work in the MSU laboratory was supported by RFBR (grants №18-34-00393 (Ku-7SK RNP interaction) and № 18-04-00542 (Ku-DNA interaction)) and the Russian Science Foundation grant 17-14-01107 (Ku interactions with TAR RNA, HEXIM1, and Cdk9) and 19-74-10021 (eCLIP data analysis). Work in the OR laboratory was supported by grants from the French Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ARNS), Sidaction, the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 691119 - EU4HIVCURE - H2020-MSCA-RISE-2015, Alsace Contre le Cancer and University of Strasbourg.

Authors' contributions

OS, OR, MG - conception of the work; OS, IG, SK, TZ, JA, FD, CW, - collection of data; OS, IG, OR, MG - analysis of data; OS, IG, SK, JA, OR, MG - writing of manuscript.

All the authors have approved the final article.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.02.016>.

References

- [1] J.A. Downs, S.P. Jackson, A means to a DNA end: the many roles of Ku, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 367–378, <https://doi.org/10.1038/nrm1367>.
- [2] A.J. Davis, B.P.C. Chen, D.J. Chen, DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway, *DNA Repair (Amst)* 17 (2014) 21–29, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.02.020>.
- [3] B.M. Sirbu, D. Cortez, DNA damage response: three levels of DNA repair regulation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013), <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012724>.
- [4] S.H. Lee, C.H. Kim, DNA-dependent protein kinase complex: a multifunctional protein in DNA repair and damage checkpoint, *Mol. Cell.* 13 (2) (2002) 159–166, <http://www.molcells.org/journal/view.html?year=2002&volume=13&number=2&spage=159>.
- [5] V.L. Fell, C. Schild-Poulter, The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 763 (2015) 15–29, <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.06.002>.
- [6] A. Lama, M. Le Bras, N. Skuli, S. Britton, P. Frit, P. Calsou, H. Prats, A. Cammas, S. Millevoi, A novel cytoprotective function for the DNA repair protein Ku in regulating p 53 mRNA translation and function, *17*, 2016, pp. 1–11, <https://doi.org/10.15252/embr.201541181>.
- [7] T.S. Fisher, V.A. Zakian, Ku: a multifunctional protein involved in telomere maintenance, *DNA Repair (Amst)* 4 (2005) 1215–1226, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.04.021>.
- [8] E.J. Gapud, B.P. Sleckman, Unique and redundant functions of ATM and DNA-PKs during V(D)J recombination, *Cell Cycle* 10 (2011), <https://doi.org/10.4161/cc.10.12.16011>, 1928–35.
- [9] A.A. Kosova, O.I. Lavrik, S.N. Hodyreva, The role of Ku antigen in the repair of apurinic/aprimidinic sites in DNA, *Mol. Biol. (Mosk)* 49 (1) (2015) 67–74, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25916111>.
- [10] V. Sharma, T. Misteli, Non-coding RNAs in DNA damage and repair, *FEBS Lett.* 587 (2013) 1832–1839, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.006>.
- [11] Y.-G. Yang, Y. Qi, RNA-directed repair of DNA double-strand breaks, *DNA Repair (Amst)*, 32, 2015, pp. 82–85, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.017>.
- [12] Y. Zhang, Q. He, Z. Hu, Y. Feng, L. Fan, Z. Tang, J. Yuan, W. Shan, C. Li, X. Hu, J.L. Tanyi, Y. Fan, Q. Huang, K. Montone, C.V. Dang, L. Zhang, Long noncoding RNA LNP1 regulates repair of DNA double-strand breaks in triple-negative breast cancer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23 (2016) 522–530, <https://doi.org/10.1038/nsmb.3211>.
- [13] J.S. Pflingsten, K.J. Goodrich, C. Taabazuing, F. Ouenzar, P. Chartrand, T.R. Cech, Mutually exclusive binding of telomerase RNA and DNA by Ku alters telomerase recruitment model, *Cell* 148 (2012) 922–932, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.033>.
- [14] S.E. Peterson, A.E. Stellwagen, S.J. Diede, M.S. Singer, Z.W. Haimberger, C.O. Johnson, M. Tzoneva, D.E. Gottschling, The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku, *Nat. Genet.* 27 (2001) 64–67, <https://doi.org/10.1038/83778>.
- [15] A.E. Stellwagen, Z.W. Haimberger, J.R. Veatch, D.E. Gottschling, Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends, *Genes Dev.* 17 (2003) 2384–2395, <https://doi.org/10.1101/gad.1125903>.
- [16] A.B. Dalby, K.J. Goodrich, J.S. Pflingsten, T.R. Cech, RNA recognition by the DNA end-binding Ku heterodimer, *RNA* 19 (2013) 841–851, <https://doi.org/10.1261/rna.038703.113>.
- [17] E.P. Hass, D.C. Zappulla, The Ku subunit of telomerase binds Sir4 to recruit telomerase to lengthen telomeres in *S. cerevisiae*, *Elife* 4 (2015), <https://doi.org/10.7554/eLife.07750>.
- [18] N.S.Y. Ting, Y. Yu, B. Pohorelic, S.P. Lees-Miller, T.L. Beattie, Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005), <https://doi.org/10.1093/nar/gki342>, 2090–8.
- [19] T.S. Fisher, A.K.P. Taggart, V.A. Zakian, Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 1198–1205, <https://doi.org/10.1038/nsmb854>.
- [20] D. Silvera, N. Koloteva-Levine, S. Burma, O. Elroy-Stein, Effect of Ku proteins on IRES-mediated translation, *Biol. Cell.* 98 (2006) 353–361, <https://doi.org/10.1042/BC20050060>.
- [21] M. Takagi, M.J. Absalon, K.G. McLure, M.B. Kastan, Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin, *Cell* 123 (2005) 49–63, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.034>.
- [22] N.E. Peters, B.J. Ferguson, M. Mazzon, A.S. Fahy, E. Krysztofinska, R. Arribas-Bosacoma, L.H. Pearl, H. Ren, G.L. Smith, A mechanism for the inhibition of DNA-PK-mediated DNA sensing by a virus, *PLoS Pathog.* 9 (2013), e1003649, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003649>.
- [23] B.J. Ferguson, D.S. Mansur, N.E. Peters, H. Ren, G.L. Smith, DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity, *Elife* 1 (2012), e00047, <https://doi.org/10.7554/eLife.00047>.
- [24] Y. Li, Y. Wu, X. Zheng, J. Cong, Y. Liu, J. Li, R. Sun, Z.G. Tian, H.M. Wei, Cytoplasm-translocated Ku70/80 complex sensing of HBV DNA induces hepatitis-associated chemokine secretion, *Front. Immunol.* 7 (2016), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00569>.
- [25] H. Sui, M. Zhou, H. Imamichi, X. Jiao, B.T. Sherman, H.C. Lane, T. Imamichi, STING is an essential mediator of the Ku70-mediated production of IFN- λ 1 in response to exogenous DNA, *Sci. Signal.* 10 (2017), <https://doi.org/10.1126/scisignal.aah5054>, eaah5054.
- [26] M. Mochikh, A. Cribier, R. Raffel, S. Amraoui, J. Cau, D. Severac, E. Dubois, O. Schwartz, Y. Bennasser, M. Benkirane, HEXIM1 and NEAT1 long non-coding RNA form a multi-subunit complex that regulates DNA-mediated innate immune response, *Mol. Cell.* 67 (2017) 387–399, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.020>, e5.
- [27] C.M. Clemson, J.N. Hutchinson, S.A. Sara, A.W. Ensminger, A.H. Fox, A. Chess, J.B. Lawrence, An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles, *Mol. Cell.* 33 (2009) 717–726, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.026>.
- [28] Q. Li, J.J. Cooper, G.H. Altwerger, M.D. Feldkamp, M.A. Shea, D.H. Price, HEXIM1 is a promiscuous double-stranded RNA-binding protein and interacts with RNAs in addition to 7SK in cultured cells, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 2503–2512, <https://doi.org/10.1093/nar/gkm150>.
- [29] A.A. Michels, A. Fraldi, Q. Li, T.E. Adamson, F. Bonnet, V.T. Nguyen, S.C. Sedore, J.P. Price, D.H. Price, L. Lania, O. Bensaude, Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor, *EMBO J.* 23 (2004) 2608–2619, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600275>.
- [30] S. Zhang, B. Schlott, M. Görlach, F. Grosse, DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) phosphorylates nuclear DNA helicase II/RNA helicase A and hnRNP proteins in an RNA-dependent manner, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1–10, <https://doi.org/10.1093/nar/gkg933>.
- [31] M. Fidaleo, E. De Paola, M.P. Paronetto, The RNA helicase A in malignant transformation, *Oncotarget* 7 (2016) 28711–28723, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7377>.
- [32] A. Dvir, S.R. Peterson, M.W. Knuth, H. Lu, W.S. Dynan, Ku autoantigen is the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992), 11920–4.
- [33] S. Yoo, W.S. Dynan, Characterization of the RNA binding properties of Ku protein, *Biochemistry* 37 (1998) 1336–1343, <https://doi.org/10.1021/bi972100w>.
- [34] N.S.Y. Ting, B. Pohorelic, Y. Yu, S.P. Lees-Miller, T.L. Beattie, The human telomerase RNA component, hTR, activates the DNA-dependent protein kinase to phosphorylate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, *Nucleic Acids*

- Res. 37 (2009) 6105–6115, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp636>.
- [35] L.S. Treviño, M.J. Bolt, S.L. Grimm, D.P. Edwards, M.A. Mancini, N.L. Weigel, Differential regulation of progesterone receptor-mediated transcription by CDK2 and DNA-PK, *Mol. Endocrinol.* 30 (2015), me20151144, <https://doi.org/10.1210/me.2015-1144>.
- [36] R.H.F.F. Wong, I. Chang, C.S.S.S. Hudak, S. Hyun, H.-Y.Y. Kwan, H.S. Sul, A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin, *Cell* 136 (2009) 1056–1072, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.12.040>.
- [37] M.W. Knuth, S.I. Gunderson, N.E. Thompson, L.A. Strasheim, R.R. Burgess, Purification and characterization of proximal sequence element-binding protein 1, a transcription activating protein related to Ku and TREF that binds the proximal sequence element of the human U1 promoter, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 17911–17920, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2211668>.
- [38] W. Giffin, H. Torrance, D.J. Rodda, G.G. Préfontaine, L. Pope, R.J. Hache, Sequence-specific DNA binding by Ku autoantigen and its effects on transcription, *Nature* 380 (1996) 265–268, <https://doi.org/10.1038/380265a0>.
- [39] J. Hazra, P. Mukherjee, A. Ali, S. Poddar, M. Pal, Engagement of components of DNA-break repair complex and NFκB in Hsp70A1A transcription upregulation by heat shock, *PLoS One* 12 (2017), e0168165, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168165>.
- [40] O.A. Shadrina, E.S. Knyazhanskaya, S.P. Korolev, M.B. Gottikh, Host proteins Ku and HMGA1 as participants of HIV-1 transcription, *Acta Naturae* 8 (1) (2016) 34–47, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27099783>.
- [41] W. Kaczmarek, S.A. Khan, Lupus autoantigen Ku protein binds HIV-1 TAR RNA in vitro, *PDF, Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (1993) 935–942.
- [42] S. Bannwarth, A. Gatignol, HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host, *Curr. HIV Res.* 3 (2005) 61–71, <https://doi.org/10.2174/1570162052727924>.
- [43] A. Marcello, M. Zoppé, M. Giacca, Critical review multiple modes of transcriptional regulation by the HIV-1 Tat transactivator, *IUBMB Life* 51 (2001) 175–181, <https://doi.org/10.1080/152165401753544241>.
- [44] A. Gatignol, Transcription of HIV: Tat and cellular chromatin, in: *Adv. Pharmacol.* 2007, pp. 137–159, [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(07\)55004-0](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(07)55004-0).
- [45] G. Diribarne, O. Bensaude, 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor, *RNA Biol.* 6 (2009) 122–128, <https://doi.org/10.4161/rna.6.2.8115>.
- [46] S.C. Sedore, S.A. Byers, S. Biglione, J.P. Price, W.J. Maury, D.H. Price, 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 (2007) 4347–4358, <https://doi.org/10.1093/nar/gkm443>.
- [47] T. Cherrier, V. Le Douce, S. Eilebrecht, R. Ricket, C. Marban, F. Dequiedt, Y. Goumon, J.C. Paillart, M. Mericskay, A. Parlakian, P. Bausero, W. Abbas, G. Herbein, S.K. Kurdistani, X. Grana, B. Van Driessche, C. Schwartz, E. Candolfi, A.G. Benecque, C. Van Lint, O. Rohr, CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (2013) 12655–12660, <https://doi.org/10.1073/pnas.1220136110>.
- [48] A.N. Anisenko, E.S. Knyazhanskaya, T.S. Zatspein, M.B. Gottikh, Human Ku70 protein binds hairpin RNA and double stranded DNA through two different sites, *Biochimie* 132 (2017) 85–93, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.11.001>.
- [49] A.N. Anisenko, E.S. Knyazhanskaya, A.O. Zalevsky, J.Y. Agapkina, A.I. Sizov, T.S. Zatspein, M.B. Gottikh, Characterization of HIV-1 integrase interaction with human Ku70 protein and initial implications for drug targeting, *Sci. Rep.* 7 (2017) 5649, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05659-5>.
- [50] I.A. Osterman, S.A. Evfratov, P.V. Sergiev, O.A. Dontsova, Comparison of mRNA features affecting translation initiation and reinitiation, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 474–486, <https://doi.org/10.1093/nar/gks989>.
- [51] F. Forouzanfar, S. Ali, C. Wallet, M. De Rovere, C. Ducloy, H. El Mekdad, M. El Maassarani, A. Ait-Ammar, J. Van Assche, E. Boutant, F. Daouad, F. Margottin-Goguet, C. Moog, C. Van Lint, C. Schwartz, O. Rohr, HIV-1 Vpr mediates the depletion of the cellular repressor CTIP2 to counteract viral gene silencing, *Sci. Rep.* 9 (2019), <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48689-x>.
- [52] Y.V. Lyupina, O.G. Zatspeina, M.V. Serebryakova, P.A. Erokhov, S.B. Abaturova, O.I. Kravchuk, O. V. Orlova, S.N. Beljarskaya, A.I. Lavrov, O.S. Sokolova, V.S. Mikhailov, Proteomics of the 26S proteasome in Spodoptera frugiperda cells infected with the nucleopolyhedrovirus, AcMNPV, *Biochim. Biophys. Acta* 1864 (2016) 738–746, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.02.021>.
- [53] J.S. Reuter, D.H. Mathews, RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis, *BMC Bioinf.* 11 (2010), <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-129>.
- [54] R. Lorenz, S.H. Bernhart, C. Höner zu Siederdissen, H. Tafer, C. Flamm, P.F. Stadler, I.L. Hofacker, ViennaRNA package 2.0, *Algorithm Mol. Biol.* 6 (2011) 26, <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>.
- [55] S. Will, T. Joshi, I.L. Hofacker, P.F. Stadler, R. Backofen, LocARNA-P: accurate boundary prediction and improved detection of structural RNAs, *RNA* 18 (2012) 900–914, <https://doi.org/10.1261/rna.029041.111>.
- [56] A. Dvir, L.Y. Stein, B.L. Calore, W.S. Dynan, Purification and characterization of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 10440–10447, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8486698>.
- [57] M. Ono, P.W. Tucker, J.D.D. Capra, Production and characterization of recombinant human Ku antigen, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 3918–3924, <https://doi.org/10.1093/nar/22.19.3918>.
- [58] Z. Zhang, L. Zhu, D. Lin, F. Chen, D.J. Chen, Y. Chen, The three-dimensional structure of the C-terminal DNA-binding domain of human Ku70, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38231–38236, <https://doi.org/10.1074/jbc.M105238200>.
- [59] J. Wang, M. Satoh, C.H. Chou, W.H. Reeves, Similar DNA binding properties of free P70 (Ku) subunit and P70/P80 heterodimer, *FEBS Lett.* 351 (1994) 219–224, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00863-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00863-9).
- [60] L.A. Hanakahi, 2-Step purification of the Ku DNA repair protein expressed in *Escherichia coli*, *Protein Exp. Purif.* 52 (2007) 139–145, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.10.002>.
- [61] J.R. Walker, R.A. Corpina, J. Goldberg, Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair, *Nature* 412 (2001) 607–614, <https://doi.org/10.1038/35088000>.
- [62] S. Paillard, F. Strauss, Analysis of the mechanism of interaction of simian Ku protein with DNA, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5619–5624, <https://doi.org/10.1093/nar/19.20.5619>.
- [63] M. Yaneva, T. Kowalewski, M.R. Lieber, Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies, *EMBO J.* 16 (1997) 5098–5112, <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.5098>.
- [64] W.S. Dynan, S. Yoo, Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 1551–1559, <https://doi.org/10.1093/nar/26.7.1551>.
- [65] E.L. Van Nostrand, G.A. Pratt, A.A. Shishkin, C. Gelboin-Burkhart, M.Y. Fang, B. Sundaraman, S.M. Blue, T.B. Nguyen, C. Surka, K. Elkins, R. Stanton, F. Rigo, M. Guttman, G.W. Yeo, Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP), *Nat. Methods* 13 (2016) 508–514, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3810>.
- [66] M.A. Durney, V.M. D'Souza, Preformed protein-binding motifs in 7SK snRNA: structural and thermodynamic comparisons with retroviral TAR, *J. Mol. Biol.* 404 (2010) 555–567, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.08.042>.
- [67] V.V. Pham, C. Salguero, S.N. Khan, J.L. Meagher, W.C. Brown, N. Humbert, H. de Rocquigny, J.L. Smith, V.M. D'Souza, HIV-1 Tat interactions with cellular 7SK and viral TAR RNAs identifies dual structural mimicry, *Nat. Commun.* 9 (2018), <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06591-6>.
- [68] T. Mizutani, A. Ishizaka, Y. Suzuki, H. Iba, 7SK small nuclear ribonucleoprotein complex is recruited to the HIV-1 promoter via short viral transcripts, *FEBS Lett.* 588 (2014) 1630–1636, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.067>.
- [69] Z. Yang, Q. Zhu, K. Luo, Q. Zhou, The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription, *Nature* 414 (2001) 317–322, <https://doi.org/10.1038/35104575>.
- [70] E.A. Dunn, S.D. Rader, Secondary structure of U6 small nuclear RNA: implications for spliceosome assembly, *Biochem. Soc. Trans.* 38 (2010) 1099–1104, <https://doi.org/10.1042/BSOT381099>.
- [71] S. Yamashita, Y. Takagi, T. Nagaike, K. Tomita, Crystal structures of U6 snRNA-specific terminal uridylyltransferase, *Nat. Commun.* 8 (2017), <https://doi.org/10.1038/ncomms15788>.
- [72] C. Wallet, M. De Rovere, J. Van Assche, F. Daouad, S. De Wit, V. Gautier, P.W.G. Mallon, A. Marcello, C. Van Lint, O. Rohr, C. Schwartz, Microglial cells: the main HIV-1 reservoir in the brain, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9 (2019) 362, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00362>.
- [73] I. Lebars, D. Martinez-Zapien, A. Durand, J. Coutant, B. Kieffer, A.-C. Dock-Bregeon, HEXIM1 targets a repeated GAUC motif in the riboregulator of transcription 7SK and promotes base pair rearrangements, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 7749–7763, <https://doi.org/10.1093/nar/gkq660>.
- [74] D. Martinez-Zapien, J.M. Saliou, X. Han, C. Atmanene, F. Proux, S. Cianféroni, A.C. Dock-Bregeon, Intermolecular recognition of the non-coding RNA 7SK and HEXIM protein in perspective, *Biochimie* (2015), <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.020>.
- [75] S. Egloff, E. Van Herreweghe, T. Kiss, Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding, *Mol. Cell Biol.* 26 (2006) 630–642, <https://doi.org/10.1128/MCB.26.2.630-642.2006>.
- [76] L. Kobbi, E. Demey-Thomas, F. Braye, F. Proux, O. Kolesnikova, J. Vinh, A. Poterszman, O. Bensaude, An evolutionary conserved Hexim1 peptide binds to the Cdk9 catalytic site to inhibit P-TEFb, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113 (2016) 12721–12726, <https://doi.org/10.1073/pnas.1612331113>.
- [77] H. Liu, C.H. Herrmann, K. Chiang, T.-L. Sung, S.-H. Moon, L.A. Donehower, A.P. Rice, 55K isoform of CDK9 associates with Ku70 and is involved in DNA repair, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397 (2010) 245–250, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.092>.
- [78] L. Shi, D. Qiu, G. Zhao, B. Corthesy, S. Lees-Miller, W.H. Reeves, P.N. Kao, Dynamic binding of Ku80, Ku70 and NF90 to the IL-2 promoter in vivo in activated T-cells, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 2302–2310, <https://doi.org/10.1093/nar/gkm117>.
- [79] G.L. Mayeur, W.J. Kung, A. Martinez, C. Izumiya, D.J. Chen, H.J. Kung, Ku is a novel transcriptional recycling coactivator of the androgen receptor in prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10827–10833, <https://doi.org/10.1074/jbc.M413336200>.
- [80] H. Wang, R. Fang, J.Y. Cho, T.A. Libermann, P. Oettgen, Positive and negative modulation of the transcriptional activity of the ETS factor ESE-1 through interaction with p300, CREB-binding protein, and Ku 70/86, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 25241–25250, <https://doi.org/10.1074/jbc.M401356200>.
- [81] H. Mizuguchi, K. Miyagi, T. Terao, N. Sakamoto, Y. Yamawaki, T. Adachi, S. Ono, Y. Sasaki, Y. Yoshimura, Y. Kitamura, N. Takeda, H. Fukui, PMA-induced dissociation of Ku86 from the promoter causes transcriptional up-regulation of histamine H(1) receptor, *Sci. Rep.* 2 (2012) 916, <https://doi.org/10.1038/>

- srep00916.
- [82] G. Nolens, J.C. Pignon, B. Koopmansch, B. Elmoualij, W. Zorzi, E. De Pauw, R. Winkler, Ku proteins interact with activator protein-2 transcription factors and contribute to ERBB2 overexpression in breast cancer cell lines, *Breast Cancer Res.* 11 (2009) R83, <https://doi.org/10.1186/bcr2450>.
 - [83] K.W. Trotter, H.A. King, T.K. Archer, Glucocorticoid receptor transcriptional activation via the BRG1-dependent recruitment of TOP2 β and Ku70/86, *Mol. Cell Biol.* 35 (2015) 2799–2817, <https://doi.org/10.1128/MCB.00230-15>.
 - [84] G. Manic, A. Maurin-Marlin, F. Laurent, I. Vitale, S. Thierry, O. Delelis, P. Dessen, M. Vincendeau, C. Leib-Mösch, U. Hazan, J.F. Mouscadet, S. Bury-Moné, Impact of the Ku complex on HIV-1 expression and latency, *PLoS One* 8 (2013), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069691>.
 - [85] S. Tyagi, A. Ochem, M. Tyagi, DNA-dependent protein kinase interacts functionally with the RNA polymerase II complex recruited at the human immunodeficiency virus (HIV) long terminal repeat and plays an important role in HIV gene expression, *J. Gen. Virol.* 92 (2011) 1710–1720, <https://doi.org/10.1099/vir.0.029587-0>.
 - [86] S. Waninger, K. Kuhen, X. Hu, J.E. Chatterton, F. Wong-Staal, H. Tang, Identification of cellular cofactors for human immunodeficiency virus replication via a ribozyme-based genomics approach, *J. Virol.* 78 (2004) 12829–12837, <https://doi.org/10.1128/JVI.78.23.12829>.
 - [87] L. Jeanson, F. Subra, S. Vaganay, M. Hervy, E. Marangoni, J. Bourhis, J.-F. Mouscadet, Effect of Ku80 depletion on the preintegrative steps of HIV-1 replication in human cells, *Virology* 300 (2002) 100–108, <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1515>.
 - [88] C. Masson, S. Bury-Moné, E. Guiot, A. Saez-Cirion, D. Schoëvaert-Brossault, C. Brachet-Ducos, O. Delelis, F. Subra, L. Jeanson-Leh, J.-F. Mouscadet, Ku80 participates in the targeting of retroviral transgenes to the chromatin of CHO cells, *J. Virol.* 81 (2007) 7924–7932, <https://doi.org/10.1128/JVI.02015-06>.
 - [89] C.T. Sheline, L.H. Milocco, K.A. Jones, Two distinct nuclear transcription factors recognize loop and bulge residues of the HIV-1 TAR RNA hairpin, *Genes Dev.* 5 (1991) 2508–2520, <https://doi.org/10.1101/gad.5.12b.2508>.
 - [90] P.D. Bieniasz, T.A. Grdina, H.P. Bogerd, B.R. Cullen, Recruitment of cyclin T1/P-TEFb to an HIV type 1 long terminal repeat promoter proximal RNA target is both necessary and sufficient for full activation of transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 7791–7796, <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.7791>.

3. Publication n°3

Inhibition of HIV-1 gene transcription by KAP1 in myeloid lineage

Ait-Ammar A, Bellefroid M, Daouad F, Martinelli V, Van Assche J, Wallet C, Rodari A, De Rovere M, Fahrenkrog B, Schwartz C, Van Lint C, Gautier V, Rohr O. Inhibition of HIV-1 gene transcription by KAP1 in myeloid lineage.

Sci Rep. 2021 Jan 29;11(1):2692.

doi: 10.1038/s41598-021-82164-w. PMID: 33514850; PMCID: PMC7846785.

Les stratégies thérapeutiques actuelles permettant de lutter contre le VIH-1 induisent une suppression de la charge virale sous les niveaux de détection des techniques classiquement utilisées. Cependant, ces traitements doivent être poursuivis durant toute la vie, sans quoi, un rebond de la virémie est rapidement observé, à l'arrêt des traitements. Les réservoirs, principale cause de ce rebond et frein à l'éradication du virus, sont présents dans différentes cellules et organes notamment dans le système nerveux central avec les cellules microgliales. Le laboratoire a démontré le rôle du facteur de transcription cellulaire CTIP2 dans cette latence par sa participation à la formation de deux complexes qui permettent l'établissement et le maintien des réservoirs. Dans cette étude, le laboratoire décrit le rôle dans la latence virale d'un autre facteur de transcription cellulaire appelé KAP1. Il a déjà été décrit que ce facteur participe à la répression de l'expression de certains gènes. Cette étude, démontre que KAP1 réprime l'expression des gènes du VIH-1. La déplétion de KAP1 stimule l'expression des gènes du VIH-1 et plus particulièrement la phase d'élongation de la transcription. Il est également retrouvé sur le promoteur du VIH-1 dans les cellules microgliales infectées latentes. Mais lorsque les cellules sont réactivées, KAP1 n'est plus recruté sur le promoteur viral. Les résultats obtenus, permettent également de démontrer qu'il y a une coopération entre le facteur répresseur CTIP2 et KAP1 afin de limiter la transcription du VIH-1. De plus, ces deux facteurs interagissent via le domaine RBCC de KAP1 et le domaine central de CTIP2. Ici, le laboratoire démontre également que KAP1 interagit avec Tat et induit sa dégradation par la voie du protéasome. Il est déjà établi que le Bromo domaine de KAP1 peut être modifié par la SUMOylation qui donne à KAP1 une activité répressive. La dégradation observée de Tat par KAP1

semble être induite par cette forme répressive SUMOylée de KAP1. En conclusion, cette étude démontre que KAP1 peut être considéré comme un acteur important de la latence du VIH-1 dans les cellules microgliales.

Dans cette publication j'ai validé certains résultats obtenus. De plus, mon projet de thèse est la suite de cette étude qui démontre un lien entre la voie de la SUMOylation et la latence post-intégrative du VIH-1.



OPEN

Inhibition of HIV-1 gene transcription by KAP1 in myeloid lineage

Amina Ait-Ammar^{1,2,3}, Maxime Bellefroid³, Fadoua Daouad¹, Valérie Martinelli⁴, Jeanne Van Assche¹, Clémentine Wallet¹, Anthony Rodari³, Marco De Rovere¹, Birthe Fahrenkrog⁴, Christian Schwartz¹, Carine Van Lint^{3,5}✉, Virginie Gautier^{2,5}✉ & Olivier Rohr^{1,5}✉

HIV-1 latency generates reservoirs that prevent viral eradication by the current therapies. To find strategies toward an HIV cure, detailed understandings of the molecular mechanisms underlying establishment and persistence of the reservoirs are needed. The cellular transcription factor KAP1 is known as a potent repressor of gene transcription. Here we report that KAP1 represses HIV-1 gene expression in myeloid cells including microglial cells, the major reservoir of the central nervous system. Mechanistically, KAP1 interacts and colocalizes with the viral transactivator Tat to promote its degradation via the proteasome pathway and repress HIV-1 gene expression. In myeloid models of latent HIV-1 infection, the depletion of KAP1 increased viral gene elongation and reactivated HIV-1 expression. Bound to the latent HIV-1 promoter, KAP1 associates and cooperates with CTIP2, a key epigenetic silencer of HIV-1 expression in microglial cells. In addition, Tat and CTIP2 compete for KAP1 binding suggesting a dynamic modulation of the KAP1 cellular partners upon HIV-1 infection. Altogether, our results suggest that KAP1 contributes to the establishment and the persistence of HIV-1 latency in myeloid cells.

The pandemic of HIV-1 infections is a global health problem. Current cART (combination antiretroviral therapy) efficiently suppresses viral expression below clinical detection levels but fails to eradicate latently infected reservoirs, the main obstacles toward an HIV cure. Indeed, most efforts have focused on understanding latency molecular mechanisms in resting memory CD4+ T-cell reservoirs. However, they are not the only source of viral rebound. Myeloid cells such as monocytes, tissue-resident macrophages and follicular dendritic cells are part of the viral reservoir^{1–3}. Protected by the blood brain barrier, the central nervous system is a major anatomic reservoir and a sanctuary for the virus⁴. Indeed, integrated SIV DNA have been reported in the CNS of infected macaques, with undetectable plasma viral load⁵. In the brain, microglial cells are the major reservoirs of latently integrated HIV-1⁶. The specific molecular mechanisms controlling HIV-1 gene silencing in these CNS resident macrophages should be taken into consideration to design strategies toward HIV cure.

We have previously reported the importance of the cellular co-factor CTIP2 (Coup-TF Interacting Protein 2) in the establishment of HIV-1 post-integration latency in microglial cells^{7–9}. CTIP2 promotes and maintains HIV-1 gene silencing by recruiting chromatin modifying complexes including HDAC1/2 (Histone Deacetylase 1/2), SUV39h1 (Suppressor of Variegation 3–9 Homolog 1) and LSD1 (Lysine-Specific histone Demethylase 1A) to the viral promoter^{9,10}. In addition, CTIP2 targets and represses HIV-1 Tat transactivation function by promoting its relocation to heterochromatin structure via the formation of a Tat-CTIP2-HP1α (Heterochromatin Protein 1α) complex¹¹ and by repressing the elongation factor P-TEFb¹². P-TEFb is the key cofactor of Tat. CTIP2 associates with an inactive form of P-TEFb to repress the CDK9 (Cyclin Dependent Kinase 9) catalytic subunit and inhibit P-TEFb sensitive genes including HIV-1¹². Finally, we reported that HMGA1 recruits this CTIP2-associated inactive P-TEFb complex to the viral promoter¹³. Importantly, Desplats et al., revealed that CTIP2

¹Université de Strasbourg, UR 7292 DHPI, FMTS, IUT Louis Pasteur, 1 Allée d'Athènes, 67300 Schiltigheim, France. ²Center for Research in Infectious Diseases (CRID), School of Medicine and Medical Science (SMMS), University College Dublin (UCD), Dublin, Ireland. ³Service of Molecular Virology, Institute for Molecular Biology and Medicine (IBMM), Université Libre de Bruxelles (ULB), Gosselies, Belgium. ⁴Laboratory Biology of the Nucleus, Institute for Molecular Biology and Medicine, Université Libre de Bruxelles, 6041 Charleroi, Belgium. ⁵These authors jointly supervised this work: Carine Van Lint, Virginie Gautier and Olivier Rohr. ✉email: cvlint@ulb.ac.be; virginie.gautier@ucd.ie; olivier.rohr@unistra.fr

expression is increased in the CSF, astrocytes and microglial cells from PLWH (Patients Living With HIV) on suppressive cART¹⁴. Collectively, our results demonstrate the importance of CTIP2 and its partners in the regulation of HIV-1 gene silencing. The HIV-1 latency is a multifactorial phenomenon involving factors dedicated to epigenetic gene silencing. KAP1 (KRAB (Krügel-Associated Box) domain-Associated Protein 1), also known as TRIM28 (Tripartite Motif-containing Protein 28) or TIF1 β (Transcriptional Intermediary Factor 1 beta) is one of them. It was identified in 1996 as an interaction partner of the KRAB-ZFPs (Krüppel-Associated Box Zinc Finger Proteins) transcription factors family members¹⁵. KAP1 is a protein with multiple functional domains that regulates the chromatin environment through interactions with different partners¹⁶. KAP1 is recruited to DNA loci via interactions of its RBCC (RING finger, 2 B-box zinc fingers, Coiled-Coil region) domain with KRAB proteins¹⁷. The RING domain of KAP1 has SUMO and Ubiquitin E3 ligase activities and induces heterochromatin structures^{18–20}, the PHD (Plant Homeo Domain) C-terminal domain has a SUMO E3 ligase activity needed to SUMOylate its own Bromo domain and the SUMOylated Bromo domain recruits the NURD and SETDB1 repressor complexes²¹. KAP1 is known to repress endogenous and latent retrovirus²². In HIV-1 infected cells, KAP1 associates with HDAC1 to deacetylate the integrase and inhibit proviral integration²³. At the transcriptional level, KAP1 has been reported to contribute to ZBRK1 (Zinc finger and BRCA1 (Breast cancer type 1 susceptibility protein)-interacting protein with A KRAB domain 1) and ZNF10 (Zinc Finger Protein 10)-mediated HIV-1 LTR repression^{24,25}. However, these studies have not yet shown the direct involvement of KAP1 and its mechanism of action. Moreover, KAP1-mediated recruitment of an inactive form of P-TEFb to most genes containing a paused RNA polymerase, including the HIV-1 LTR promoter to favor gene expression upon stimulation^{26,27}. Despite these controversies, KAP1 is mainly shown as a viral gene repressor. KAP1 restricts the activation of MLV (Murine Leukemia Virus) and HTLV-1 (Human T-Lymphotropic Virus type 1) genes^{28,29}. More recently, the restriction factor APOBEC3A (Apolipoprotein B mRNA-Editing enzyme Catalytic polypeptide-like 3G) has been described to recruit KAP1 to suppress HIV-1 transcription³⁰. In addition, a recent study suggests that KAP1 represses HIV-1 gene expression by mediating CDK9 SUMOylation resulting in P-TEFb repression in T cells³¹. Surprisingly, since KAP1 functions have been extensively studied in T lineage, nothing has been done to define its role and its mechanism of action on HIV-1 infection in myeloid cells.

Here, we studied the influence of KAP1 on HIV-1 expression and its specific mechanism of action in monocytic and microglial cells, the resident macrophages and the main viral reservoirs in the brain. In microglial cells KAP1 repressed HIV-1 gene expression. While KAP1 was found associated with the silenced HIV-1 promoter in the CHME5-HIV microglial model of latency, stimulations released KAP1 from the provirus. RNA interference-mediated knockdown of KAP1 in monocytic cell line latently infected with HIV-1 showed an increase in viral reactivation and transcription. Mechanistically, KAP1 repressed the HIV-1 promoter activity in the absence and in the presence of the viral transactivator Tat. Moreover, KAP1 had a major repressive impact on Tat function. We report that KAP1 interacts physically and colocalizes with Tat in the nucleus of microglial cells to promote its degradation via the proteasome pathway. Finally, KAP1 was found associated with the repressor CTIP2. They both cooperated to repress Tat function. Altogether our results highlight the contribution and the specific mechanism of action of KAP1 in the establishment and the persistence of HIV-1 post-integration latency in cells from myeloid origin.

Results

KAP1 cooperates with CTIP2 to repress HIV-1 gene expression in microglial cells. The functional impact of KAP1 overexpression or depletion on HIV-1 gene expression was examined on microglial cells expressing the pNL4-3 Δ ENV Luc HIV molecular clone (Fig. 1A,B) or the episomal vector LTR-Luc (Fig. 1C,D). In both cases we observed that expression of increasing amounts of KAP1 inhibited the HIV-1 promoter activity in a dose-dependent manner, while KAP1 depletion stimulated its activity.

These results are consistent with a transcriptional control of the viral expression by KAP1 and support a repressive role of KAP1 on HIV-1 gene expression. Of note, KAP1 protein expression levels were assessed by Western blot and quantified (Figs. 1E,F). Given KAP1 capacity to silence HIV-1 gene expression, we next examined the presence of KAP1 at the silenced viral promoter in CHME5-HIV microglial model of HIV-1 latency³². Chromatin IP experiments using 5'LTR specific primers revealed the presence of KAP1 associated with the silent 5'LTR region of the provirus (Fig. 2A). However, treatments with TNF α and HMBA to induce viral reactivation significantly displaced KAP1 from the promoter (Fig. 2A). The activation of HIV-1 promoter was validated by increased binding of the RNA Pol II (Fig. 2A) and by quantification of the GFP positive cells (Fig. 2B). Our results suggest that KAP1 targets the latent viral promoter to promote HIV-1 post-integration latency in microglial cells. To confirm these results in other models of infected myeloid cells, we took advantage of THP89 cells latently infected with recombinant p89.6 HIV-1 reporter virus wherein the GFP gene is inserted in the viral genome³³. We generated THP89 monocytic cell lines expressing nontarget (shNT) or KAP1 (shKAP1) small hairpin (sh) RNAs. The efficiency of KAP1 knockdown in the selected puromycin resistant cells was validated by Western blot (Fig. 3A). Using these cells, we assessed the role of KAP1 in viral latency and reactivation by monitoring GFP expression. Flow cytometry analysis and GFP transcripts quantifications revealed an increase of GFP positive cells upon KAP1 knockdown (Fig. 3A,B). Activation of HIV-1 gene transcription in THP89 cells following KAP1 depletion was further studied by quantifying initiated transcripts (TAR region), elongated transcripts (*gag* and *tat* regions), and the multiply spliced transcripts (Ms RNA) (Fig. 3C). Significant higher levels of elongated and multiply-spliced transcripts were observed in KAP1 knocked-down cells. Altogether, our results indicate that KAP1 depletion enables the release of HIV-1 transcriptional blocks underlying latency.

We have previously reported the importance of the cellular cofactor CTIP2 in the establishment and the persistence of HIV-1 latency^{9,10,13}. Since KAP1 and CTIP2 have been both involved in the control of HIV-1 gene expression, we next investigated whether they interact functionally. We observed that overexpressing KAP1

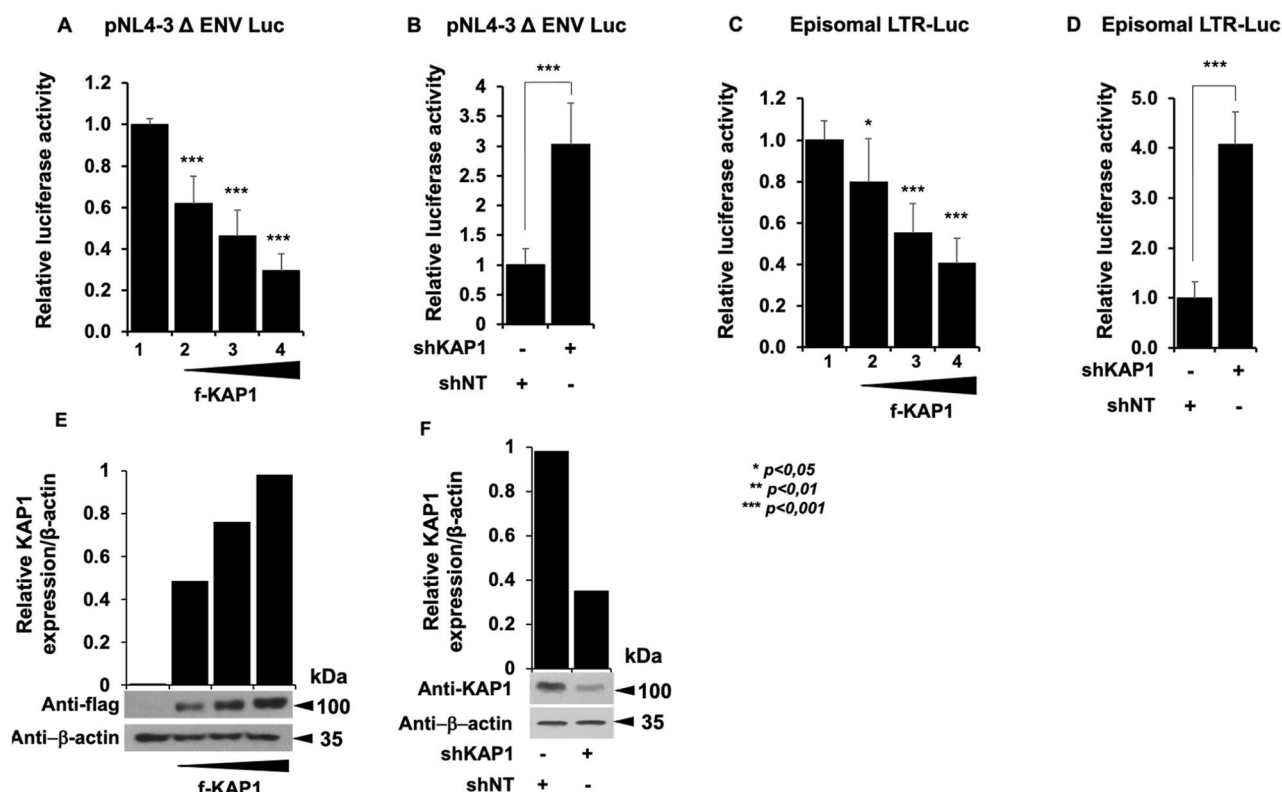


Figure 1. KAP1 suppresses HIV-1 expression (A–D) Microglial cells were transfected with the pNL4-3 Δ ENV Luc vectors (A,B) or with episomal vector LTR-Luc (C,D) in the presence of an increasing dose of KAP1 (A,C), or with a KAP1 knockdown (shKAP1) (B,D). Luciferase activity was measured 48 h post-transfection and after lysis of the cells. Luciferase values were normalized to those obtained with LTR-Luc or pNL4-3 Δ ENV Luc alone. A t-test was performed on 3 independent experiments (P (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)). (E,F) Overexpressions of KAP1, as well as knockdown efficiencies, were validated by Western blotting. KAP1 expression levels were quantified and presented relatively to β-actin expression, using image J software. Full-length blots are presented in Supplementary Figure 1.

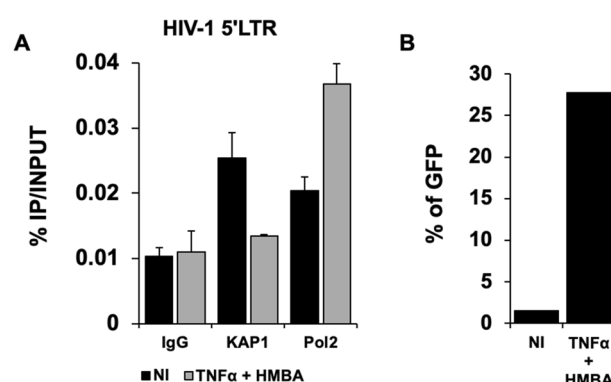


Figure 2. KAP1 binds to the latent HIV-1 promoter (A) Microglial cells latently infected with HIV-1 containing the GFP reporter gene were treated for 24 h with TNFα and HMBA. Cells were subjected to ChIP-qPCR experiments targeting the binding to the HIV-1 5'LTR promoter (B) The same microglial cells were also analyzed by flow cytometry. The results are presented as percentages of immunoprecipitated DNA compared to the input DNA (% IP/INPUT). This figure is representative of 3 independent experiments.

and CTIP2 had a stronger repressive activity on the HIV-1 provirus than overexpressions of each protein alone (Fig. 4A, column 4 versus 2 and 3). Similarly, we observed a modest but significant cooperation in the context of a simultaneous depletion of the two proteins (Fig. 4B, column 4 versus 2 and 3). As shown in Fig. 4C,D, similar results were obtained upon analysis of the activity of 5'LTR viral promoter. To ensure that the effects can be correlated to the expression levels of CTIP2 and KAP1, we performed Western blot analysis. The results demonstrated the efficiencies of the overexpression and the knockdown at the protein level (Figs. 4E,F). Since

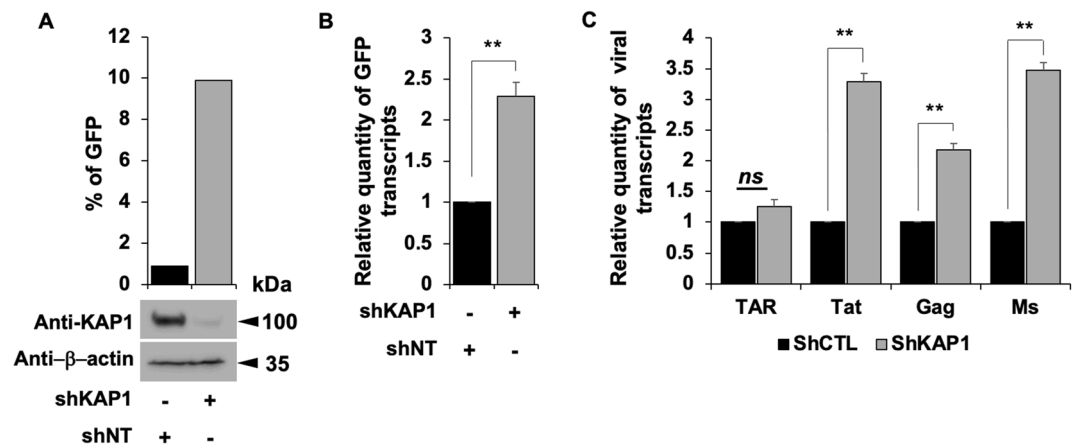


Figure 3. Reactivation of HIV-1 gene transcription in myeloid models of latency upon KAP1 depletion (A–C) The HIV-1 infected monocytic (THP89) cells containing a GFP reporter gene were transduced either with non-targeting shRNA (indicated as shNT) or shKAP1. (A) The GFP expression was examined by flow cytometry and the KAP1 protein expression level was assessed on total cellular extract by Western blot. (B,C) Total RNA products from shNT or shKAP1 THP89 transduced cells were retrotranscribed. GFP and HIV-1 gene transcripts as Initiated (TAR region), elongated (*gag*, *tat*), and multiple-spliced RNA (Ms RNA) were quantitated by real-time RT-PCR. The relative mRNA level was first normalized to GAPDH then to the shNT-transduced condition. Results are means from duplicate. Full-length blots are presented in Supplementary Figure 2.

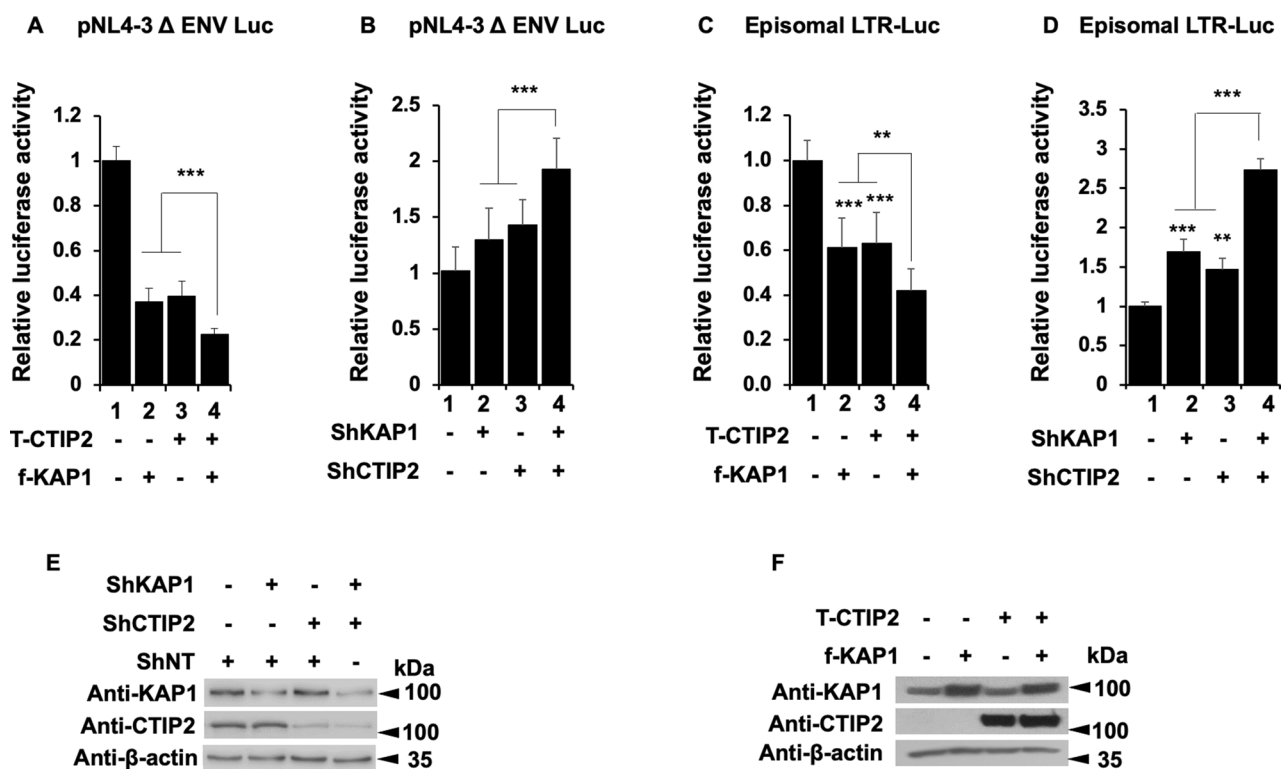


Figure 4. Kap1 and CTIP2 together contribute to the silencing of HIV-1 gene expression (A–D) Microglial cells were transfected with the pNL4-3 Δ ENV Luc vectors (A,B) or LTR-Luc (C,D) under the indicated conditions. The cells were lysed after 48 h of transfection. The luciferase activities were measured and normalized to the conditions where the pNL4-3 Δ ENV Luc and LTR-Luc vectors were transfected alone. A t-test was performed on 3 independent experiments (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). (E,F) Over-expression and knockdown of the indicated proteins were validated by Western blot. Full-length blots are presented in Supplementary Figure 3.

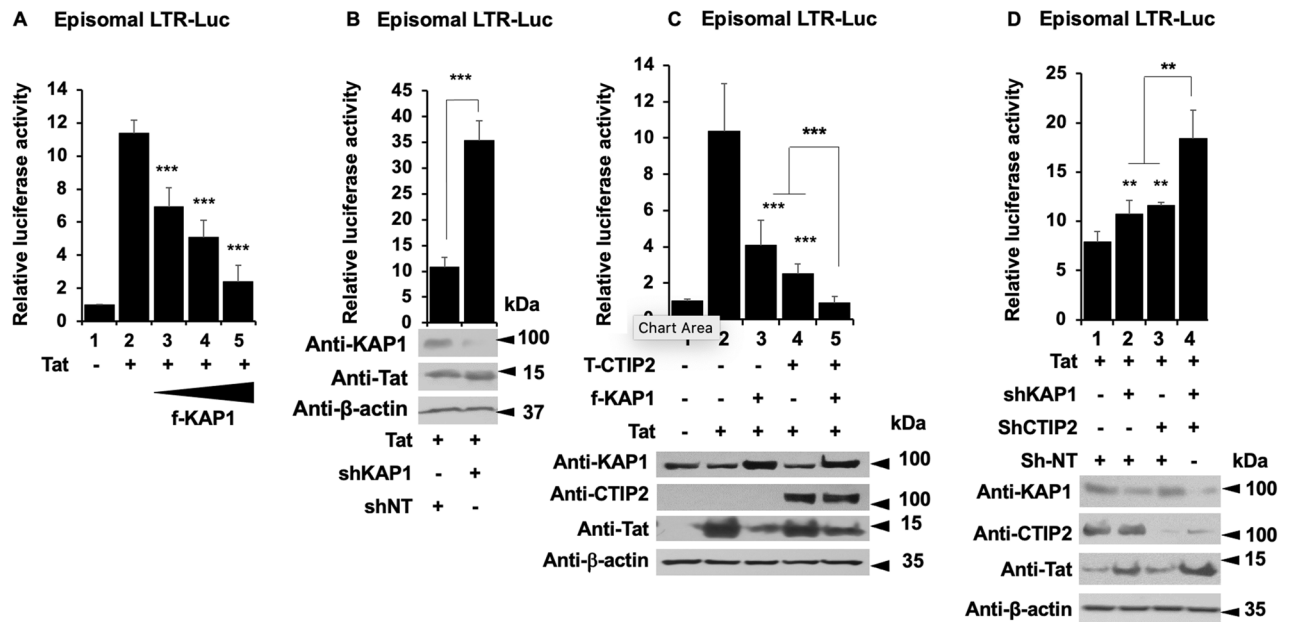


Figure 5. KAP1 inhibits Tat activity and cooperates with CTIP2 for this purpose (A–D) Microglial cells were transfected with LTR-Luc vector under the indicated conditions. After 48 h of transfection, the luciferase activities were measured after cell lysis and normalized under conditions where LTR-Luc vector were transfected alone. A t-test was performed on 3 independent experiments P (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). (C,D) Over-expression and knockdown of the indicated proteins were validated by Western blot. Full-length blots are presented in Supplementary Figure 5.

KAP1 has been shown to promote the formation of heterochromatin environments³⁴, we investigated the role of KAP1 on H3K9me3 and HP1 recruitments at the HIV-1 promoter. As shown in supplementary figure 4, KAP1 depletion reduced H3K9me3 and HP1 β but not HP1 α bindings at the 5'LTR.

We have reported that CTIP2 represses Tat function by inducing its relocation in heterochromatin structures¹¹. We therefore investigated the impact of KAP1 on Tat function. As expected, Tat expression stimulated the viral promoter activity (Fig. 5A, column 2). However, while the overexpression of KAP1 repressed this transactivation (Fig. 5A, columns 3 to 5 versus 2), the knockdown of KAP1 promoted Tat activity (Fig. 5B). These results confirmed that KAP1 regulates the initiation (–Tat) and the elongation (+Tat) steps of HIV-1 gene transcription. We next modulated the expression of KAP1 together with CTIP2. As expected, overexpression of KAP1 and CTIP2 alone inhibited Tat function (Fig. 5C, column 3 and 4). Moreover, their concomitant overexpression further repressed Tat-mediated activity (Fig. 5C, column 5). Logically, the concomitant depletion of KAP1 and CTIP2 favored Tat-mediated transactivation (Fig. 5D). As shown in Fig. 5C,D, the efficiencies of the overexpression and the depletions were controlled by Western blot. Taken together, our results demonstrate that KAP1 and CTIP2 cooperate functionally to repress HIV-1 gene expression in microglial cells.

KAP1 interacts and colocalizes with Tat. We have shown that KAP1 inhibits Tat function. In addition, we found that KAP1 cooperates with CTIP2 in Tat repression. These results prompted us to investigate a physical association of KAP1 with Tat. We performed co-immunoprecipitation targeting ectopically expressed KAP1 (Fig. 6A) and endogenously expressed KAP1 (Fig. 6B). As shown, Tat associates with KAP1 in both conditions. To next visualize the association of KAP1 and Tat in the nucleus, microglial cells expressing GFP-KAP1 and DsRed-Tat were analyzed by direct fluorescence microscopy. As previously described in the literature, KAP1 was found in the nucleoplasm and excluded from the nucleoli (Fig. 6C upper panel)³⁵. In DsRed-Tat expressing cells, Tat is localized in both nucleoplasm and nucleoli (Fig. 6C, middle panel)^{36,37}. In cells expressing GFP-Kap1 and DsRed-Tat, we observed that Tat colocalizes with KAP1 in the nucleoplasm but not in the nucleoli, (Fig. 6C, lower panel). GFP-KAP1 recruited Tat in KAP1-induced structures as shown by the yellow staining.

KAP1 promotes Tat degradation by the proteasome pathway. To further characterize mechanistically the repression of Tat by KAP1, we observed the pattern of Tat expression in the presence of increasing amount of KAP1 (Fig. 7A). We found that Tat expression was inversely correlated to the protein level of KAP1 upon KAP1 overexpression (Fig. 7A) and KAP1 depletion (Fig. 7B). To determine if these modulations of Tat protein expression are controlled post-transcriptionally, we quantified Tat mRNAs by RT-qPCR, in the presence or lack of KAP1 overexpression. Since the amount of Tat mRNA remained unaffected by KAP1 (Fig. 7C), we hypothesized that KAP1 overexpression leads to Tat depletion by regulating the stability of the protein. Among the mechanisms controlling protein half-life in eukaryotic cells, the degradation via the proteasome pathway has been long studied. Interestingly, Tat was previously described to be directed towards proteasome degradation^{38–43}. To determine whether the reduced expression of Tat in the presence of KAP1 is related to pro-

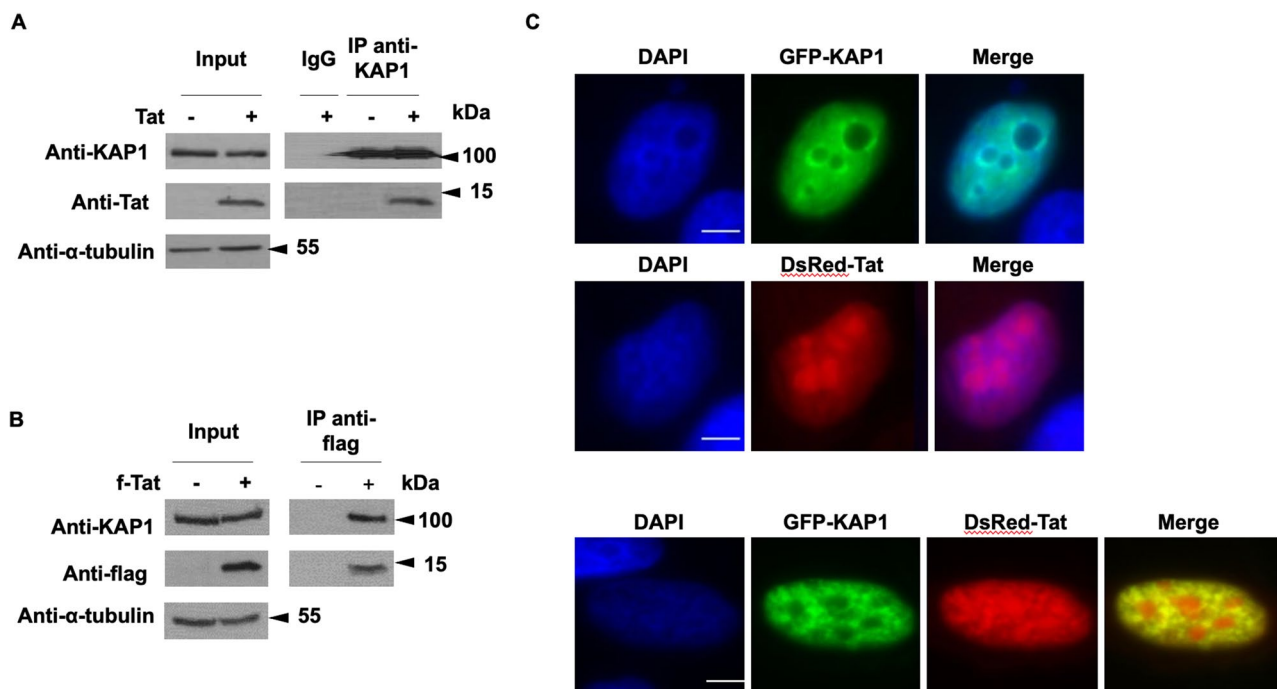


Figure 6. KAP1 interacts and colocalize with Tat (A,B) HEK cells were transfected with the indicated vectors. After 48 h of transfection, the nuclear protein extracts were immunoprecipitated with KAP1 (A) and flag (B) antibodies. The eluted protein complexes were analyzed by Western blotting for the presence of the indicated proteins. (C) Microglial cells were transfected for 48 h with the indicated vectors and subjected to observation under a fluorescence microscope. Scale bars are set to 5 μ m. Full-length blots are presented in Supplementary Figure 6.

teasome degradation, we quantified Tat expression levels in the presence of KAP1 and the proteasome inhibitor MG132, (Fig. 7D). As expected, in the absence of MG132, KAP1 expression reduced significantly Tat expression (Fig. 7D, column 2 versus 1). However, MG132 treatment increased Tat protein levels by about 30% (Fig. 7D column 3 versus 1) and counteracted KAP1-mediated degradation of Tat (Fig. 7D, column 4 versus 2). Thus, our results suggest that KAP1 targets Tat to degradation via the proteasome pathway. Additional experiments performed with the inhibitor of translation Cycloheximide and the proteasome inhibitor Carfilzomib⁴⁴ further confirmed that KAP1-mediated depletion of Tat does not occur at the translation step but needs an active proteasome pathway (supplementary figure 8).

Tat degradation is mediated by the Bromo domains of KAP1. Using different KAP1 deletion mutants, we next identified the KAP1 domain required for Tat degradation (Fig. 7E). While deletion of the RBCC domain (Δ RBCC) did not affect KAP1-mediated degradation of Tat (Fig. 7E, column 3), deletions of the Bromo domain (Δ Bromo) and, at a lesser extent, of the PHD domain (Δ PHD) impaired Tat degradation (Fig. 7E, columns 4, 5 and 6 versus 2). We next used two mutants of KAP1, one mimicking a constitutive phosphorylation of Serine 824 (S824D) and the second which results in a non-phosphorylated form of KAP1 (S824A) (Fig. 7F). Of note, the phosphorylated status of the Serine 824 (located in the Bromo domain) determines the repressive activity of KAP1 and its ability to interact with the NuRD and SETDB1 repressor complexes via the Bromo domain⁴⁵. While expression of KAP1 S824A promoted the degradation of Tat (Fig. 7E, column 5 versus 2), the S824D mutant did not (Fig. 7E, column 4). Overall, these results suggest that KAP1-mediated degradation of Tat may be regulated by phosphorylation of Serine 824 and thereby by the balance between the phosphorylated activating—and the dephosphorylated repressive forms of KAP1.

CTIP2 is interacting with KAP1 and competes with Tat for KAP1 binding. We demonstrated that KAP1 functionally cooperates with CTIP2 to inhibit HIV-1 gene expression. Since both CTIP2 and KAP1 have been reported to be associated with an inactive form of P-TEFb, we hypothesized that their functional interactions may result from physical association^{12,26}. Immunoprecipitations targeting CTIP2 demonstrate that KAP1 associates with CTIP2 in RNA independent manner (Fig. 8A, column 4 and 6). Similar results were obtained after KAP1 immunoprecipitation (Fig. 8B, column 8 and 10) in the context of ectopic protein expression. We next confirmed these observations by immunoprecipitations targeting the endogenous proteins (Fig. 8C). To delineate the interface between KAP1 and CTIP2, we used different truncations of KAP1 and CTIP2 (Fig. 8D,E). We found that CTIP2 interacts with Δ PHD, Δ Bromo, Δ PHD/ Δ Bromo deleted KAP1 (Fig. 8D, columns 10, 11, 12), but not with the Δ RBCC KAP1, (Fig. 8D, column 9). On the other hand, KAP1 binds only the 1-354 and 145-434 truncated forms of CTIP2 (Fig. 8E, column 11 and 12). Altogether, we found that the RBCC domain

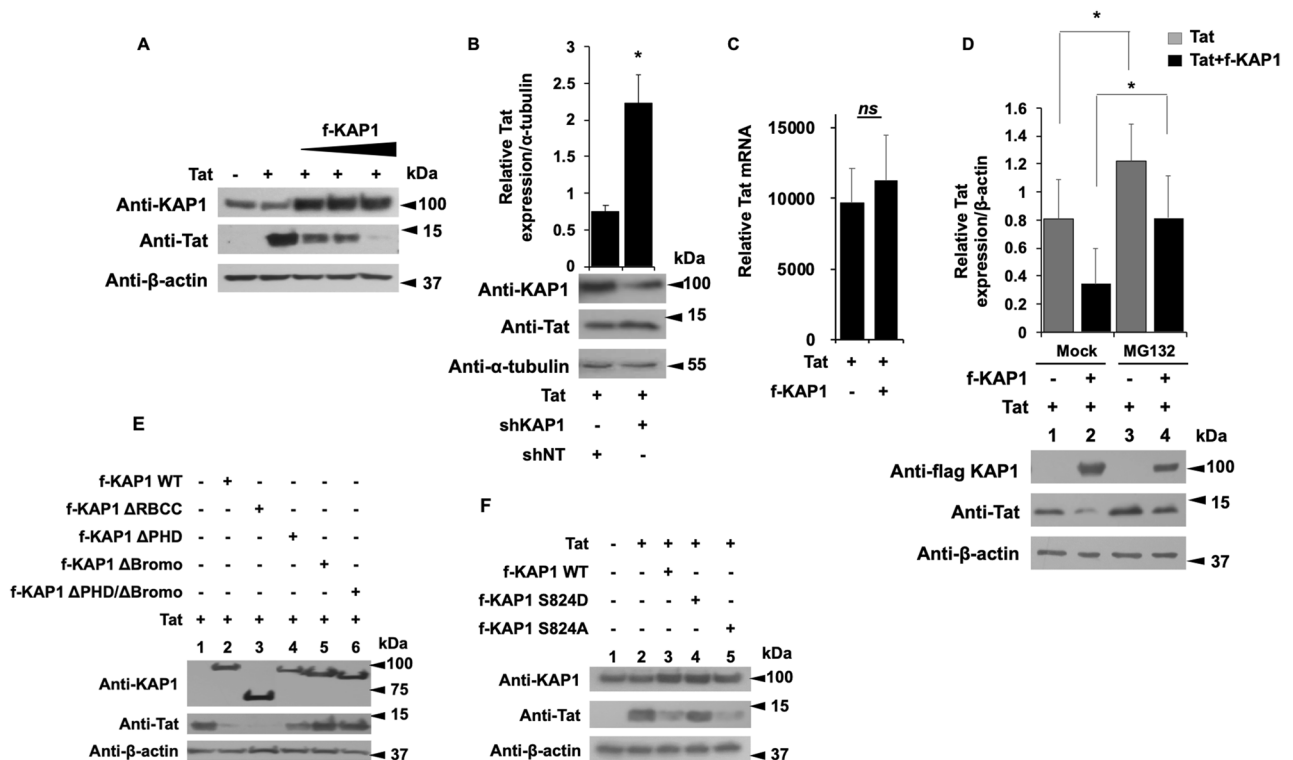


Figure 7. The Bromo domain of KAP1 promotes Tat degradation via the proteasome pathway (**A,B,E,F**) HEK cells were transfected with the indicated vectors. 48 h later, the nuclear proteins were analyzed by Western blot for the presence of the indicated proteins. (**B**) Tat expression level whose relative quantification to the α -tubulin was carried out using the image J software. (**C**) The RNA extracts from HEK cells transfected with the indicated plasmids were submitted to RT-qPCR experiments against Tat. The relative mRNA level of Tat was normalized to the GAPDH gene. (**D**) HEK cells were transfected with the indicated vectors. After 18 h of transfection, the cells were treated or not with 50 μ M of MG132 for 6 h. 24 h post-transfection, the total protein extracts were analyzed by Western blot for the presence of KAP1 and Tat. Tat expression level was quantified relatively to β -actin expression, using image J software. A t-test was performed on 3 (**B,C**) and 5 (**D**) independent experiments ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). Full-length blots are presented in Supplementary Figure 7.

of KAP1 associated with the central region of CTIP2 previously shown to mediate Tat binding¹¹. The interface between the central region of CTIP2 (amino acid residue 144–354) and the RBCC domain of KAP1 (amino acid residue 65–376) is indicated by red lines in Fig. 8F. It should be noted that Tat has an additional CTIP2 binding site located at its C-terminal domain, between residues 717 and 813¹¹. Co-immunoprecipitation experiments carried out with nuclear extracts expressing CTIP2, KAP1 and increasing amount of Tat, showed that Tat expression displaced CTIP2 from KAP1 suggesting that Tat may have a better affinity for KAP1 than CTIP2, (Fig. 8F, column 9 and 10).

Discussion

Antiretroviral therapy has significantly improved the management of HIV-1 infection. However, despite ART efficiency, it is still impossible to cure HIV-1 infected patients. Latently infected reservoirs are the major hurdles toward an HIV cure. Among the major reservoirs are the resting CD4⁺ T cells and monocyte-macrophage lineage, including microglial cells. These reservoirs escape immune surveillance and cannot be targeted by current therapies. HIV-1 gene transcription is silenced by epigenetic modifications. These epigenetic changes remain a major obstacle to virus eradication and patients cure. We have previously shown that CTIP2 is a major player in the establishment and persistence of HIV-1 latency in microglial cells^{9,10,12}. In the present work we report the role and the mechanism of action of KAP1 as new partner of CTIP2 in the control of HIV-1 expression in myeloid cells. Functionally, KAP1 suppressed HIV-1 expression and contributed to viral latency in myeloid cells. In accordance, we found KAP1 associated with the latent HIV-1 promoter but not after reactivation. Interestingly, in CD4⁺ T cells, KAP1 binding to the HIV-1 promoter has been reported to be insensitive to reactivations³¹. These controversies suggest that the mechanisms underlying KAP1 functions may be cell type specific. It is now well established that the repressive form of KAP1 is SUMOylated on its Bromo domain⁴⁶ and associates with the NuRD and SETDB1 repressor complexes (reviewed in⁴⁷). The repressors CTIP2 and KAP1 have multiple similarities. They both interact with the NuRD complex^{48,49}, the DNA repair enzymes PARP1 and PRKDC^{50,51} and a repressive form of P-TEFb complex including the 7SKsnRNP²⁶. CTIP2 and KAP1 have also common target genes like p21^{45,52}. Our results demonstrate a functional cooperation between the two repressors to repress HIV-1 gene transcription. KAP1 promotes a repressive chromatin environment at the viral promoter as previously

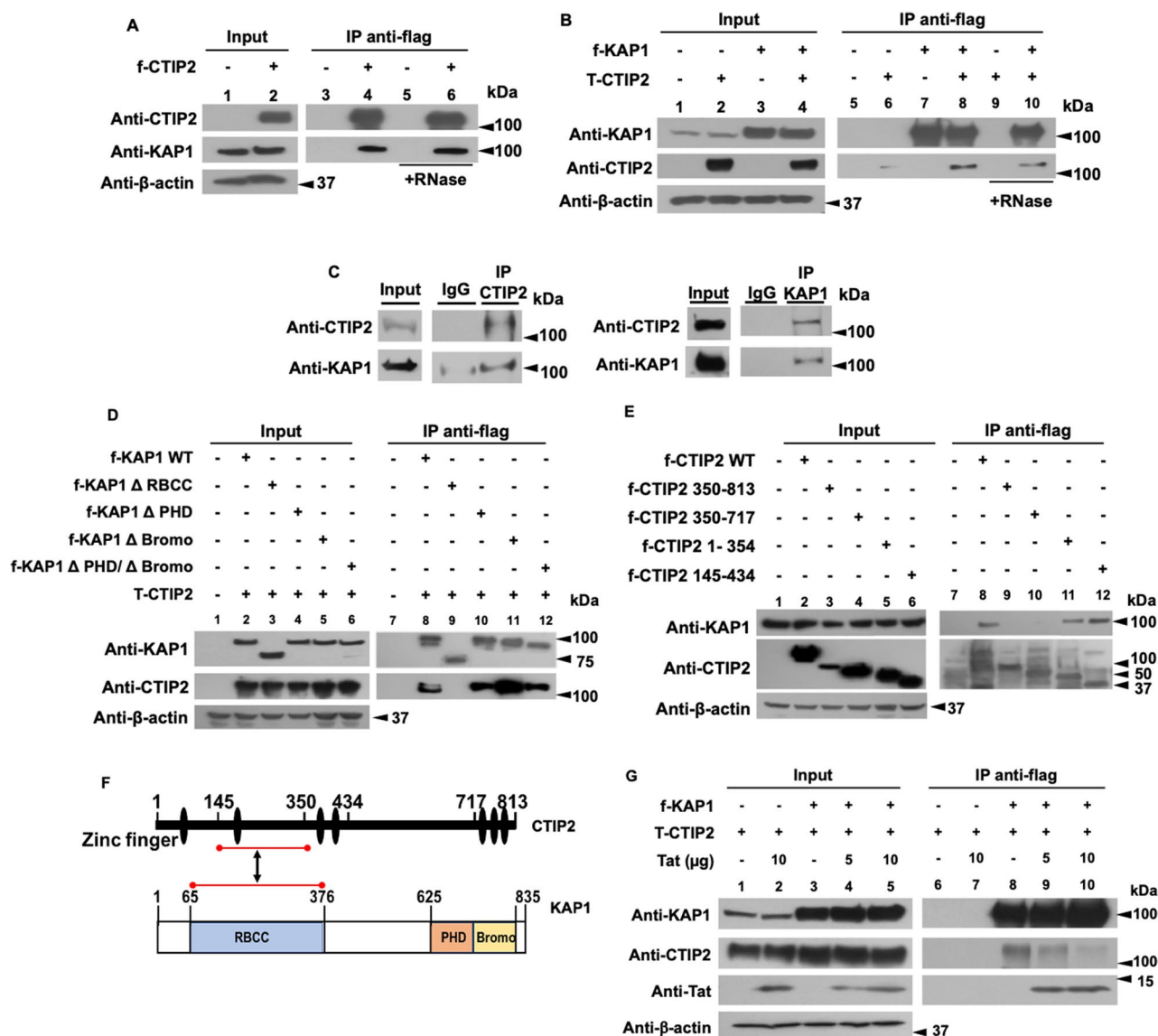


Figure 8. CTIP2 interacts with KAP1 in an RNA independent manner and competes with Tat for KAP1 binding (A,B) HEK cells were transfected with flag-CTIP2 (A) or flag-KAP1 and Tap-CTIP2 (B). 48 h post-transfection, the nuclear protein extracts, treated or not with RNase, were subjected to immunoprecipitation with the flag antibody. The immunoprecipitated complexes were tested by Western blot for the presence of KAP1 (A) and CTIP2 (B). (C) The nuclear protein extracts of microglial cells were analyzed by Western blot for the expression of CTIP2 and KAP1 and submitted to immunoprecipitation experiments with CTIP2 and KAP1 antibodies. (D) The HEK cells were transfected with Tap-CTIP2 and one of the vectors encoding f-KAP1 WT: wild type, or KAP1 deleted from the RBCC domain (ΔRBCC), or PHD (ΔPHD), or Bromo (ΔBromo) or both PHD and Bromo domains (ΔPHD/ΔBromo), or with f-CTIP2 deletion mutants, as indicated (E). After 48 h, the nuclear protein extracts were immunoprecipitated with flag antibody. The eluted protein complexes were analyzed by Western blot for the presence of CTIP2 and KAP1. (F) The interface between CTIP2 and KAP1 structural domains are presented. (G) HEK cells were transfected with the indicated vectors in the presence of an increasing dose of Tat. After 48 h, the nuclear protein extracts were treated as in (D). The results are representative of at least two independent experiments. Full-length blots are presented in Supplementary Figure 9.

shown for CTIP2⁹. Moreover, KAP1 and CTIP2 interact physically. We report that the RBCC domain of KAP1 associates with the central domain of CTIP2. CTIP2 association with LSD1 and HMG1 has been described to inhibit Tat-dependent viral gene transcription and to promote its relocation in heterochromatin structures^{10,11,13}. Our results show that KAP1 cooperates with CTIP2 to repress Tat function. In addition, we found that KAP1 interacts and colocalizes with Tat in the nucleoplasm of microglial cells. The HIV-1 Tat transactivator is essential to the elongation step of the viral gene mainly because of its ability to recruit P-TEFb at the HIV-1 initiated transcripts. Thereby, inhibiting Tat activity results in hindering the positive feedback loop required for efficient HIV-1

transcription. Interestingly, Tat has been shown to be sensitive to proteasome degradation^{38–43,53}. We observed that Tat expression was inversely proportional to KAP1 expression level suggesting that KAP1-mediated repression of Tat function results from Tat degradation. KAP1 has been shown to promote proteasomal degradation of targets proteins by its RBCC domain^{54–56}. Surprisingly, we observed that Tat degradation was not sensitive to RBCC depletion, weakly sensitive to PHD depletion, but mediated by the Bromo domain of KAP1. In line with these results, the point mutation of the KAP1 Serine 824 located in the Bromo domain abrogated Tat degradation. The Bromo domain is known to be modified by SUMOylation giving to KAP1 its repressive form. The phosphorylation of Serine 824 causes a loss of this SUMOylation state and a loss of KAP1 repressive activity⁴⁵. Thus, our results suggest that Tat degradation is promoted by repressive SUMOylated forms of KAP1. Finally, we show that KAP1 interacts with Tat with higher affinity than with CTIP2. Indeed, upon increasing Tat expression, CTIP2 is displaced from KAP1 associated complex suggesting that the dynamic of KAP1 association with CTIP2 depends on the virological status of the cells. Altogether, our results suggest that KAP1 is a major player in the control of HIV-1 gene expression in microglial cells, the main HIV-1 reservoir in the brain. Moreover, they further highlight the cell type specific mechanism of action of the repressors involved in viral latency. CTIP2 and KAP1 are highly expressed in resting T cells and depleted upon activation^{31,57}. In addition, increased levels of CTIP2 are associated with persistence of HIV-1 latency in the brain¹⁴ and increased level of KAP1 in the peripheral blood of gastric cancer patients is a biomarker predicting cancer stage progression^{58–61}. By transposition to what has been observed in oncology and virology, these repressors and their associated enzymatic activities may constitute good targets in therapies aiming at curing the HIV-1 infected patients.

Methods

Plasmids. The following plasmids: pcDNA3, flag CTIP2, flag-CTIP2 350–813, 350–717, 1–354 and 145–434, Tap-CTIP2, flag-Tat, DsRed-Tat, ShCTIP2, LTR-Luc, pNL4-3Δ Env Luc have been described previously^{9,11,12}. The flag-KAP1 plasmids, flag-KAP1 S824A/D come from Dr. David K. Ann⁴⁵. The vectors shKAP1 and shNT (non-target) were gift from Dr. Ivan D'orso²⁶. The plasmids flag-KAP1WT, flag-KAP1 ΔRBCC, ΔPHD, ΔBromo, ΔPHD/ΔBromo were provided by Dr. Florence Cammas (IRCM Montpellier). GFP-KAP1 comes from Addgene (#65397).

Cell culture. The human microglial cell line (provided by Prof. M. Tardieu, Paris, France)⁶², HEK293T cell lines and CHME5 cell lines latently infected with HIV-1³² were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10% decompartmented fetal calf serum and 100 U/ml penicillin–streptomycin. When indicated, the cells were treated with 50 or 0.2 μM MG132 for 6 or 20 h respectively, with 50 μg/ml cycloheximide for 4 h and with 25 or 50 nM carfilzomib for 20 h. THP89 cell lines were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% decompartmented fetal calf serum and 100 U/ml penicillin–streptomycin.

Antibodies and reagents. The list of antibodies and other chemical reagents used in this work are listed in Table 1.

Lentiviral production. HEK cells seeded at a density of 4×10^6 and grown in a 10 cm dish were transfected with the different shRNAs (shNT or shKAP1)-containing plasmids (9 μg), the pVSV-G (2.25 μg) and the psPAX2 (6.75 μg) packaging vectors by the calcium phosphate transfection method according to the manufacturer's protocol (TaKaRa; Calphos). 72 h post-transfection, the virus-containing supernatant (8 ml) was filtered (Steriflip; Merck) before being concentrated $20 \times$ (14,000 rpm, 1h30, 4°C) and stored at -80°C.

Generation of stable THP89 knock-down for KAP1. THP89 cells were transduced by spinoculation as previously described²⁶. Briefly, 100 μl of $20 \times$ concentrated lentiviral stock was added to 10^6 cells previously washed and resuspended in 400 μl of complete growth medium containing polybrene (8 μg/ml). Cells were then centrifuged (3200 rpm 1 h, 32°C) before being incubated for 2 h at 37°C. After this incubation, cells were washed and transferred in 1 ml complete growth medium in a 12-well dish. 48 h post-infection, infected cells were selected by puromycin selection at a final concentration of 1 μg/ml for 2 weeks. GFP positive cells were measured by Flow Cytometry. Total proteins and RNAs were then extracted as described above for RT-qPCR and Western blotting.

Nuclear protein extract. Cells seeded at a density of 3×10^6 and grown in a 10 cm dish were transfected with the indicated vectors (30 μg) using the calcium phosphate coprecipitation method. 48 h post-transfection, cells were lysed for 10 min on ice in a buffer containing: 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl and 0.5 mM DTT. After one minute of centrifugation at 13,000g, the nuclear pellet was lysed for 30 min on ice in another buffer containing: 20 mM HEPES, 25% glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT. After 2 min of centrifugation at 13,000g, the supernatant was analyzed by immunoprecipitation and Western blotting. Anti-proteases were systematically added to the lysis buffers.

Total protein extract. Cells seeded at a density of 0.5×10^6 cells per well and grown in a 6-well dish were transfected using the calcium phosphate coprecipitation method with the indicated vectors (12 μg). After 24 h, the cells were lysed on ice for 50 min using a buffer containing: 10 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS. After 10 min centrifugation at 13,000g, the supernatant was stored for Western blot analysis. Antiproteases were systematically added to the lysis buffers.

Reagent	Reference
Anti-CTIP2 antibody	A300-383A Bethyl
Anti-KAP1 antibody	Ab10483 Abcam
Anti-Tat antibody	ab43014 Abcam
Anti- β -actin antibody	A1978 Sigma-Aldrich
Anti-Flag antibody	F3165 Sigma-Aldrich
Anti-GFP antibody	632592 Clontech
Anti- α -tubulin antibody	Ab4074 Abcam
Anti-UBC9 antibody	610749 BD Biosciences
Anti-HA antibody	901 501 Biolegend
Anti-mouse IgG-HRP	Sc-358914 Santa Cruz
Anti-rabbit IgG-HRP	Sc-2004 Santa Cruz
Anti-KAP1 ChIP grade antibody	C15410236-100 Diagenode
Anti-RNA Pol II ChIP grade antibody	14958 Cell signaling
Anti-H3K9me3 ChIP grade antibody	1396 Cell signaling
Anti-HP1 α ChIP grade antibody	2616 Cell signaling
Anti-HP1 β ChIP grade antibody	8676 Cell signaling
anti-SP1 ChIP grade antibody	9389 Cell signaling
Rabbit IgG	C15410206 Diagenode
Mouse IgG	C15400001-15 Diagenode
Reverse PCR	1708890 Bio-Rad
Quantitative PCR	SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix – Bio-Rad
Anti-proteases	000000011873580001 Sigma-Aldrich
MG132	BML-PI102-0025 ENZO Life Sciences
Carfilzomib	AG-CR1-3669-M001 Bio-Connect
TNF α	300-01A PeproTech
HMBA	224235 Sigma-Aldrich
DMA	20660 Thermo Scientific
Anti-flag immunoprecipitation beads	A-2220 Sigma-Aldrich
Protein G magnetic beads	C03010021-220 Diagenode
Protein A magnetic beads	C03010020-220 Diagenode
Protein A Agarose/Salmon Sperm DNA	16-157 Sigma-Aldrich

Table 1. Antibodies and reagents.

Co-immunoprecipitation and Western blot analysis. Immunoprecipitations were performed on 500 μ g of nuclear protein extracts using anti-flag M2 gel (Sigma-Aldrich) or by using Diagenode A/G protein-coupled magnetic beads to target endogenous proteins. Briefly, the nuclear protein extract was cleared for 1 h under rotation at 4 °C with the A/G protein-coupled magnetic beads. Meanwhile, the beads were coated under rotation with 1 μ g of antibody for 30 min at room temperature. After the preclearing step, the beads were removed, replaced by the antibody coated beads and incubated overnight at 4 °C under rotation. The day after, the incubated beads were washed 2 times with a low salt buffer (50 mM TrisHCl pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.5mMEDTA, 0.5% NP40, 10% glycerol), 2 times with a high salt buffer (50 mM TrisHCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP40, 10% glycerol) and one time with a low salt buffer. The immunoprecipitated proteins were eluted by heating at 100 °C during 15 min in 4 $\times$ Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad). Immunoprecipitated protein complexes were subjected to Western blot analysis. The proteins were detected using the antibodies as indicated and visualized by a Thermo Scientific Chemiluminescence Detection System (Pierce-ECL Western Blotting Substrate 32106).

Fluorescence microscopy. The microglial cells were seeded at 0.8×10^6 and grown on coverslip in a 24-well plate. The cells were transfected after 24 h with the indicated vectors by the Jetprime (Polyplus transfection) method, according to the instructions of the supplier. After 48 h of transfection, the cells were fixed with PBS containing 2% formaldehyde for 15 min. The cells were then washed 3 times with PBS. The coverslip was mounted on a slide using the Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich) containing 1 μ g/ml DAPI. Cells fluorescence was observed under a fluorescence microscope and imaged using a Zeiss Axio Observer inverted microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with Zeiss Plan-Apochromat 100x/1.4 oil objective. Images were acquired using the microscope system software AxioVision V 4.8.2.0 and processed using Image J software.

Luciferase assay. Microglial cells, seeded at 0.4×10^6 in a 48-well dish, were transfected in triplicate by the calcium phosphate coprecipitation method with the indicated vectors. 48 h post-transfection, the cells were col-

Cellular model	Target	Forward primer	Reverse primer
HEK	<i>tat</i>	ACTCGACAGAGGAGAGCAAG	GAGATCTGACTGTTCTGATGA
	<i>GAPDH</i>	GGACCTGACCTGCCGTCTAGAA	GGGTGTCGCTGTTGAAGTCAGAG
THP89	TAR	GTTAGACCAGATCTGAGCCT	GTGGGTTCCCTAGTTAGCCA
	<i>tat</i>	TGTTGCTTTTCATTGCCAAGCTTGTTT	GTCTTCGTCGCTGTCTCCGCT
	<i>gag</i>	AAAAGCATTGGGACCAGGAG	CTTGCTTTATGGCCGGGT
	Ms RNA	GGATCTGTCTCTGTCTCTCTCCACC	ACAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCA
	<i>GFP</i>	GAGGGCGATGCCACCTAC	GGTGGTGCAGATGAACTTCAG

Table 2. PCR primers.

lected and the luciferase activity was measured using the Dual-Glo Luciferase Assay system (Promega Madison, USA) and normalized to Renilla Luciferase activity.

Chromatin immunoprecipitation assay. Chromatin immunoprecipitation assay was performed following ChIP assay kit (EMD Millipore) protocol. Briefly, HIV-1 CHME5 cells were seeded at 3×10^6 in T175 Corning flask. 24 h later, the cells were mock treated or stimulated with 10 ng/ml of TNF α (Tumor Necrosis Factor α) and 5 mM of HMBA (Hexamethylene bisacetamide). After 24 h the cells were trypsinated, counted and then washed with PBS. THP89 transduced cells were seeded at 0.9×10^6 cell/ml. After 24 h the cells were, counted and then washed with PBS. In both conditions, the cells were resuspended at ratio of 4×10^6 cell/ml of PBS. The cells were cross-linked with a freshly made DMA (dimethyl adipimidate) at 5 mM for 25 min followed by a second 8 min cross-link with formaldehyde at 1%. The cross-linking reaction was stopped by 0.125 M of Tris–Glycine solution. Cells were washed twice with ice cold PBS then resuspended to a ratio of $10 \times 10^6/300$ μ l of SDS Lysis buffer (Tris HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, 1% SDS) containing proteases inhibitors. The chromatin was sonicated (Bioruptor Plus, Diagenode) 40 min (30 s on, 30 s off) to obtain DNA fragments of 200–400 bp. Chromatin immunoprecipitations were performed with chromatin from 5×10^6 cells and 5 μ g of antibodies. IgG was used as a control for immunoprecipitation. The DNA was purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (11732676001 Sigma-Aldrich). Quantitative Real Time PCR reactions were performed with the TB Green Premix Ex Taq II (TAKARA) as recommended by the supplier. Relative quantification using standard curve method was performed for the primer pair, and 96-well plates (MU38900 Westburg) were read in a StepOnePlus PCR instrument (Applied Biosystems). The Results are presented as percentages of immunoprecipitated DNA compared to the input DNA (% IP/INPUT). The 5'LTR forward and reverse Primer sequences used are respectively: 5'-TGGAAAATCTCTAGCAGTGGC-3', 5'-GAGTCCTGCGTCGAGAGATCT-3' for CHME5 HIV-1 provirus and 5'-TCTCTAGCAGTGGCGCCCGA-3', 5'-GCCCTCGCCTCTTGCTGTG-3' for THP89 HIV-1 provirus.

Flow cytometry. CHME5 HIV-1 cells mock treated or stimulated with 10 ng/ml of TNF α and 5 mM of HMBA for 24 h or either THP89 HIV-1 cells transduced with lentiviral particles were washed twice in PBS, resuspended in PBS containing 4% paraformaldehyde and fixed for 1 h at 4 °C in the dark. Cells were then washed twice in PBS and resuspended in FACS buffer (PBS, 0.1% BSA, 0.1% NaN $_3$). 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.

mRNA quantification. Total RNA was extracted from cells expressing the indicated vectors according to the QIAGEN RNeasy Plus Kit protocol or with Tri-Reagent (TRC118, MRC) according to the manufacturer's instructions. Following DNase treatment (AM1907, Invitrogen), the cDNAs were produced using Bio-Rad Reverse Transcription Kit (iScript Reverse Transcription Supermix) or the PrimeScript RT reagent kit (RR037A, TaKaRa). cDNAs from HEK and THP89 cells were quantified by quantitative PCR using Bio-Rad's SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix. Data were calculated using the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method and normalized to the amount of GAPDH. The PCR primers used are presented in Table 2.

Statistical analysis. Data were analyzed by performing the student t-test using Microsoft Excel. Values of $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***) were considered significant. The results were represented as mean and standard deviation of at least 3 independent experiments.

Received: 5 June 2020; Accepted: 13 January 2021

Published online: 29 January 2021

References

- Kumar, A., Abbas, W. & Herbein, G. HIV-1 latency in monocytes/macrophages. *Viruses* **6**, 1837–1860 (2014).
- Kandathil, A. J., Sugawara, S. & Balagopal, A. Are T cells the only HIV-1 reservoir? *Retrovirology* **13**, 86 (2016).
- Honeycutt, J. B. *et al.* HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy. *Nat. Med.* **23**, 638–643 (2017).

4. Gelman, B. B. *et al.* Neurovirological correlation with HIV-associated neurocognitive disorders and encephalitis in a HAART-era cohort. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **62**, 487–495 (2013).
5. Clements, J. E., Gama, L., Graham, D. R., Mankowski, J. L. & Zink, M. C. 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 (2011).
6. Llewellyn, G. N., Alvarez-Carbonell, D., Chateau, M., Karn, J. & Cannon, P. M. HIV-1 infection of microglial cells in a reconstituted humanized mouse model and identification of compounds that selectively reverse HIV latency. *J. Neurovirol.* **24**, 192–203 (2018).
7. Le Douce, V., Cherrier, T., Riclet, R., Rohr, O. & Schwartz, C. The Many lives of CTIP2: From AIDS to cancer and cardiac hypertrophy. *J. Cell. Physiol.* **229**, 533–537 (2014).
8. Le Douce, V. *et al.* HIC1 controls cellular- and HIV-1-gene transcription via interactions with CTIP2 and HMGA1. *Sci. Rep.* **6**, 34920 (2016).
9. Marban, C. *et al.* Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J.* **26**, 412–423 (2007).
10. Le Douce, V. *et al.* LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1904–1915 (2012).
11. Rohr, O. *et al.* 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 (2003).
12. Cherrier, T. *et al.* CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 12655–12660 (2013).
13. Eilebrecht, S. *et al.* HMGA1 recruits CTIP2-repressed P-TEFb to the HIV-1 and cellular target promoters. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4962–4971 (2014).
14. Desplats, P. *et al.* Molecular and pathologic insights from latent HIV-1 infection in the human brain. *Neurology* **80**, 1415–1423 (2013).
15. Moosmann, P., Georgiev, O., Le Douarin, B., Bourquin, J. P. & Schaffner, W. Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KIX1. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4859–4867 (1996).
16. Iyengar, S. & Farnham, P. J. KAP1 Protein: An enigmatic master regulator of the genome. *J. Biol. Chem.* **286**, 26267–26276 (2011).
17. Iyengar, S., Ivanov, A. V., Jin, V. X., Rauscher, F. J. & Farnham, P. J. Functional analysis of KAP1 genomic recruitment. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1833–1847 (2011).
18. Liang, Q. *et al.* Tripartite motif-containing protein 28 is a small ubiquitin-related modifier E3 ligase and negative regulator of IFN regulatory factor 7. *J. Immunol.* **187**, 4754–4763 (2011).
19. Riclet, R. *et al.* Disruption of the interaction between transcriptional intermediary factor 1β 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 (2009).
20. Yang, Y. *et al.* Acetylated hsp70 and KAP1-mediated Vps34 SUMOylation is required for autophagosome creation in autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 6841–6846 (2013).
21. Garvin, A. J. *et al.* The deSUMOylase SENP7 promotes chromatin relaxation for homologous recombination DNA repair. *EMBO Rep.* **14**, 975–983 (2013).
22. Groh, S. & Schotta, G. Silencing of endogenous retroviruses by heterochromatin. *Cell Mol. Life Sci.* **74**, 2055–2065 (2017).
23. Allouch, A. *et al.* The TRIM family protein KAP1 Inhibits HIV-1 integration. *Cell Host Microbe* **9**, 484–495 (2011).
24. Nishitsuji, H., Abe, M., Sawada, R. & Takaku, H. ZBRK1 represses HIV-1 LTR-mediated transcription. *FEBS Lett.* **586**, 3562–3568 (2012).
25. Nishitsuji, H., Sawada, R., Sugiyama, R. & Takaku, H. ZNF10 inhibits HIV-1 LTR activity through interaction with NF-κB and Sp1 binding motifs. *FEBS Lett.* **589**, 2019–2025 (2015).
26. McNamara, R. P. *et al.* KAP1 recruitment of the 7SK snRNP complex to promoters enables transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* **61**, 39–53 (2016).
27. Morton, E. L. *et al.* Transcriptional circuit fragility influences HIV proviral fate. *Cell Rep.* **27**, 154–171.e9 (2019).
28. Lee, A., Cingöz, O., Sabo, Y. & Goff, S. P. Characterization of interaction between Trim28 and YY1 in silencing proviral DNA of Moloney murine leukemia virus. *Virology* **516**, 165–175 (2018).
29. Wolf, D. & Goff, S. P. Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs. *Nature* **458**, 1201–1204 (2009).
30. Taura, M., Song, E., Ho, Y.-C. & Iwasaki, A. Apobec3A maintains HIV-1 latency through recruitment of epigenetic silencing machinery to the long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 2282–2289 (2019).
31. Ma, X. *et al.* TRIM28 promotes HIV-1 latency by SUMOylating CDK9 and inhibiting P-TEFb. *Life* **8**, e42426 (2019).
32. Wires, E. S. *et al.* Methamphetamine activates nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) and induces human immunodeficiency virus (HIV) transcription in human microglial cells. *J. Neurovirol.* **18**, 400–410 (2012).
33. Kutsch, O., Benveniste, E. N., Shaw, G. M. & Levy, D. N. Direct and quantitative single-cell analysis of human immunodeficiency virus type 1 reactivation from latency. *J. Virol.* **76**, 8776–8786 (2002).
34. Meylan, S. *et al.* 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 (2011).
35. Ryan, R. F. *et al.* 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 (1999).
36. Coiras, M. *et al.* Modifications in the human T cell proteome induced by intracellular HIV-1 Tat protein expression. *Proteomics* **6**, S63–S73 (2006).
37. Ruben, S. *et al.* Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* **63**, 1–8 (1989).
38. Ali, A. & Banerjee, A. C. Curcumin inhibits HIV-1 by promoting Tat protein degradation. *Sci Rep* **6**, 27539 (2016).
39. Balachandran, A. *et al.* Identification of small molecule modulators of HIV-1 Tat and Rev protein accumulation. *Retrovirology* **14**, 7 (2017).
40. Gargano, B., Fiorillo, M., Amente, S., Majello, B. & Lania, L. p14ARF is capable of promoting HIV-1 tat degradation. *Cell Cycle* **7**, 1433–1439 (2008).
41. Hong, H.-W., Lee, S.-W. & Myung, H. Induced degradation of Tat by nucleocapsid (NC) via the proteasome pathway and its effect on HIV transcription. *Viruses* **5**, 1143–1152 (2013).
42. Li, J. *et al.* Long noncoding RNA NRON contributes to HIV-1 latency by specifically inducing tat protein degradation. *Nat. Commun.* **7**, 11730 (2016).
43. Wan, Z. & Chen, X. Triptolide inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting proteasomal degradation of Tat protein. *Retrovirology* **11**, 88 (2014).
44. Sacco, A. *et al.* Carfilzomib-dependent selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome leads to antitumor activity in Waldenström's Macroglobulinemia. *Clin. Cancer Res.* **17**, 1753–1764 (2011).
45. Li, X. *et al.* Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* **282**, 36177–36189 (2007).
46. Ivanov, A. V. *et al.* PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol. Cell* **28**, 823–837 (2007).

47. Cheng, C.-T., Kuo, C.-Y. & Ann, D. K. KAP1 in charge of multiple missions: Emerging roles of KAP1. *World J Biol Chem* **5**, 308–320 (2014).
48. Cismasiu, V. B. *et al.* 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 (2008).
49. Schultz, D. C., Friedman, J. R. & Rauscher, F. J. 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-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev.* **15**, 428–443 (2001).
50. Quénet, D. *et al.* 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.* **22**, 3853–3865 (2008).
51. Tomimatsu, N., Mukherjee, B. & Burma, S. Distinct roles of ATR and DNA-PKcs in triggering DNA damage responses in ATM-deficient cells. *EMBO Rep.* **10**, 629–635 (2009).
52. Cherrier, T. *et al.* p21(WAF1) gene promoter is epigenetically silenced by CTIP2 and SUV39H1. *Oncogene* **28**, 3380–3389 (2009).
53. Imai, K. *et al.* Cyclin T1 stabilizes expression levels of HIV-1 Tat in cells. *FEBS J.* **276**, 7124–7133 (2009).
54. Jin, X. *et al.* MAGE-TRIM28 complex promotes the Warburg effect and hepatocellular carcinoma progression by targeting FBP1 for degradation. *Oncogenesis* **6**, e312 (2017).
55. Okamoto, K., Kitabayashi, I. & Taya, Y. KAP1 dictates p53 response induced by chemotherapeutic agents via Mdm2 interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 216–222 (2006).
56. Pineda, C. T. *et al.* Degradation of AMPK by a cancer-specific ubiquitin ligase. *Cell* **160**, 715–728 (2015).
57. Avram, D. & Califano, D. The multifaceted roles of Bcl11b in thymic and peripheral T cells - impact on immune diseases. *J Immunol* **193**, 2059–2065 (2014).
58. Czerwińska, P., Mazurek, S. & Wiznerowicz, M. The complexity of TRIM28 contribution to cancer. *J Biomed Sci* **24**, 63 (2017).
59. Czerwińska, P. *et al.* TRIM28 multi-domain protein regulates cancer stem cell population in breast tumor development. *Oncotarget* **8**, 863–882 (2017).
60. Hu, M. *et al.* Expression of KAP1 in epithelial ovarian cancer and its correlation with drug-resistance. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 17308–17320 (2015).
61. Wang, Y.-Y., Li, L., Zhao, Z.-S. & Wang, H.-J. Clinical utility of measuring expression levels of KAP1, TIMP1 and STC2 in peripheral blood of patients with gastric cancer. *World J. Surg. Oncol.* **11**, 81 (2013).
62. Janabi, N., Peudenier, S., Héron, B., Ng, K. H. & Tardieu, M. 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 (1995).

Acknowledgement

We thank Dr. David K. Ann, Dr. Ivan D'orso and Dr. Florence Cammas for providing vectors. We thank participants to the ANRS (French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis) RHIVIERA (Remission of HIV Era) Consortium for helpful discussion.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: O.R., C.V.L. and V.G. Performed the experiments: A.A.A., M.B. and F.D. Analyzed the data: O.R., C.V.L., V.G., A.A.A., M.B., F.D., V.M., J.V.A., C.W., A.R., M.D.R., B.F. and C.S. Wrote the paper: A.A.A. and O.R.

Funding

This work was supported by the French agency for research on AIDS and viral hepatitis (ANRS); SIDACTION; the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 691119-EU4HIVCURE-H2020-MSCA-RISE-2015; RHIVIERA; The Belgian Fund for Scientific Research (FRS-FNRS, Belgium), the “Fondation Roi Baudouin”, the Walloon Region (Fonds de Maturation) and the university of Brussels (Action de Recherche Concertée (ARC) grant). The laboratory of CVL is part of the ULB-Cancer Research Centre (U-CRC). AAA is a fellow of the Wallonie-Bruxelles International program and of the Marie Skłodowska Curie COFUND action. MB is a doctoral fellow from the Belgian Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA). CVL is Directeur de Recherches of the F.R.S-FNRS, Belgium. AR is funded by a postdoctoral fellowship from the Université Libre de Bruxelles (ULB) - Action de Recherche Concertée (ARC) program (2016-2021 grant). We thank ViiV Healthcare.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82164-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.L., V.G. or O.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

4. Publication n°4 (en préparation)

UBC9 and the SUMO pathway contribute to HIV-1 gene silencing by a SUMO-mediated degradation of Tat in microglial cells.

Jeanne Van Assche¹, Amina Aït-Ammar², Clémentine Wallet¹, Fadoua Daouad¹, Virginie Gautier³, Carine Van Lint², Christian Schwartz¹, Olivier Rohr¹

¹ *Université de Strasbourg, UR7292 DHPI, FMTS, Faculté de Médecine, 1 Allée d'Athènes, 67300 Schiltigheim, France.*

² *Service of Molecular Virology, Institute for Molecular Biology and Medicine (IBMM), Université Libre de Bruxelles (ULB), Gosselies, Belgium*

³ *CEPHR, School of Medicine and Medical Science (SMMS), University College Dublin (UCD), Dublin, Ireland*

La persistance du VIH-1 dans des cellules infectées de façon latente est l'un des principaux obstacles à l'éradication du virus de l'organisme. Dans cette étude, nous démontrons l'influence de la SUMOylation sur la transcription et sur l'expression du VIH-1 dans les cellules microgliales. Ces cellules sont le principal réservoir du VIH-1 dans le système nerveux central. Principalement associée à une répression de l'expression des gènes, la SUMOylation est une modification post-traductionnelle qui régule de nombreuses fonctions nucléaires. Nous avons démontré que UBC9, enzyme clé de la voie SUMO, réprime la transcription et plus largement l'expression du virus dans les cellules microgliales. De plus, nous démontrons que la protéine virale Tat, primordiale à la transcription, est SUMOylée. Cette modification par la voie SUMO participe à sa dégradation par la voie du protéasome. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine nous ont permis de démontrer la présence des marques SUMO corrélée à celle de CTIP2 sur le promoteur du VIH-1 latent dans les cellules microgliales. En revanche, lorsque l'expression virale est réactivée, les SUMO ainsi que CTIP2 ne sont plus recrutés sur le promoteur du VIH-1 actif. Enfin, des combinaisons de SUMOi et d'HDACi permettent de réactiver de façon synergique l'expression du VIH-1 dans un modèle de cellules infectées latentes. En conclusion, l'effet répresseur de la voie SUMO sur l'expression du VIH-1 ainsi que la dégradation de Tat via la SUMOylation et la voie du protéasome participent à la latence post-intégrative du VIH-1.

Cette publication comporte mes résultats concernant mon projet de thèse principal. J'ai réalisé la quasi-totalité des expériences.

UBC9 and the SUMO pathway contribute to HIV-1 gene silencing by a SUMO-mediated degradation of Tat in microglial cells.

Jeanne Van Assche¹, Amina Aït-Ammar², Clémentine Wallet¹, Fadoua Daouad¹, Virginie Gautier³, Carine Van Lint², Christian Schwartz¹, Olivier Rohr¹

¹ Université de Strasbourg, UR7292 DHPI, FMTS, Faculté de Médecine, 1 Allée d'Athènes, 67300 Schiltigheim, France.

² Service of Molecular Virology, Institute for Molecular Biology and Medicine (IBMM), Université Libre de Bruxelles (ULB), Gosselies, Belgium

³ CEPHR, School of Medicine and Medical Science (SMMS), University College Dublin (UCD), Dublin, Ireland

HIV-1 persistence in latently infected cells found in reservoirs is one of the main obstacle to viral eradication. Consequently, understanding mechanisms that govern latency is crucial to develop new therapeutic strategies. Here we report the influence of SUMOylation on HIV-1 gene transcription and viral expression in microglial cells, the major HIV-1 reservoir in the central nervous system. Mostly associated to gene silencing, SUMOylation is a post-translational modification regulating many nuclear functions. UBC9 is the key enzyme of the SUMO pathway. We report that UBC9 represses HIV-1 gene transcription and more broadly its expression in microglial cells. UBC9 promotes the SUMOylation of the HIV-1 Tat transactivator of transcription and its subsequent degradation via the proteasomal pathway. In addition, Chromatin IP experiments showed the presence of SUMO1 and SUMO2/3 together with CTIP2 at the latent HIV-1 promoter. Interestingly, reactivations of the latently integrated virus in the microglial model of HIV-1 latency, displaced CTIP2 and the SUMO marks from the promoter. Finally, we report that treatments with the SUMO inhibitor ML792 alone, or in combination with the HDCAi (romidepsine and SAHA) reactivated the expression of the latently integrated viral genome. Altogether, our results suggest that SUMOylation at the HIV-1 gene promoter and SUMO-mediated degradation of Tat contribute to HIV-1 post-integrative latency.

Introduction

Since Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) identification in 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983), combination of the antiretroviral therapy (cART) implementation in 1996 and despite major advances in HIV-1 research (Barré-Sinoussi et al., 2013), HIV-1 infection remains a chronic infection with the requirement of a long-lived treatment. cART significantly decreases HIV-1 mortality by reducing circulating viruses but HIV-1 cure is still not achieved. Interruption of the treatment is associated with increased levels of plasmatic viremia within two weeks (Davey et al., 1999; García et al., 1999; Mata et al., 2005). It is now well established that the viremia rebound observed is mainly due to the persistence of viruses in latently infected cells called reservoirs (Chun et al., 1997; Finzi et al., 1997; Wong et al., 1997). The central nervous system (CNS) contains HIV-1 cellular reservoirs and is considered as a sanctuary for HIV-1 due to the presence of the blood brain barrier (BBB) which affects the immune response and reduces cART penetration (Letendre et al., 2008). A recent study demonstrated that HIV-1 DNA was found in perivascular macrophages and microglial cells confirming them as a HIV-1 cellular reservoir (Ko et al., 2019). Microglial cells are long-lived cells which divide very slowly (Réu et al., 2017). Different studies on cellular or animal models and on cohort of patients demonstrated that microglial cells are infected by HIV-1 and constitute a consistent HIV-1 reservoir (Avalos et al., 2017; Gama et al., 2017; Honeycutt et al., 2017; Ko et al., 2019; Whitney et al., 2014). HIV-1 persistence in the brain causes neurocognitive impairments because it induces chronic inflammation. The activation of immune cells from the CNS produces inflammatory cytokines and chemokines (Lamers et al., 2010; Salemi et al., 2005; Sutherland and Brew, 2018). Moreover some viral proteins like Tat, gp120 or Nef which are released by productively infected cells are neurotoxics (review (Rao et al., 2014)). To cure infected patients, it is now well established that latently infected cells have to be eliminated or at least reservoir's size has to be reduced (Wallet et al., 2019). Understanding the molecular mechanisms of HIV-1 latency is crucially needed for the implementation of new HIV-1 cure strategies and new drug design. Viral latency in microglial cells involves different mechanisms. We have previously demonstrated that the cellular transcription factor CTIP2, takes a central role in HIV-1 latency. First of all, CTIP2 participates in the establishment of HIV-1 latency by recruiting chromatin modifying enzymes to the 5' LTR. CTIP2 is a scaffolder protein for HDAC1, HDAC2,

SUV39H1 and LSD1 recruitment. This complex finally induces the establishment of a heterochromatin environment which silences HIV-1 expression by repressing HIV-1 gene transcription (Le Douce et al., 2012; Marban et al., 2005, 2007). However, CTIP2 also plays a key role in the persistence of HIV-1 latency. It sequesters the elongation factor PTEF-b in an inactive complex composed by 7SK snRNA, HEXIM1 and HMGA1. This second complex inhibits the elongation of the initiated HIV-1 gene transcripts and limits the reactivation of the integrated provirus (Cherrier et al., 2013). Recently, we identified KAP1 as a new CTIP2 partner that contributes to HIV-1 latency in myeloid cells (Ait-Ammar et al., 2021). KAP1 is an E3 SUMO ligase promoting the SUMOylation of target proteins by the E2 SUMO conjugation enzyme UBC9. SUMOylation is a post-translational modification essential to eukaryote survival. This post-translational modification implies a cascade of enzymatic reactions involving E1, E2 and E3 enzymes. The purpose of the SUMOylation is the conjugation of a SUMO protein to the lysin residue of a target protein. SUMOylation regulates several nuclear functions such as replication, DNA repair or transcription. UBC9 is the only enzyme that catalyzes the conjugation of SUMO marks to the target protein (review in (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007)). It is now well established that HIV-1 latency is due to several blocks in HIV-1 gene transcription. As mentioned before one of the major actors of this multimodal gene silencing is the cellular factor CTIP2. Numerous studies have shown that SUMOylation modifications are associated with transcription repression (review in (Rosonina et al., 2017)). Here we report that SUMO marks are associated with the latently integrated HIV-1 promoter in microglial cells. In addition, results obtained upon modulations of UBC9 expression levels and upon treatments inhibiting the SUMO pathway suggest that HIV-1 gene transcription is repressed by SUMOylation. Interestingly, modulations of UBC9 expression levels were inversely correlated with the expression of the HIV-1 Tat transactivator. We have previously shown that KAP1 induces Tat degradation. Here we further demonstrate that KAP1 promotes Tat SUMOylation and that Tat degradation is sensitive to the SUMO pathway. Finally, we report that sequential treatments of microglial models of HIV-1 latency with SUMOi and HDACi stimulated the reactivation of the latent virus.

Materials and methods

Plasmids :

The following plasmids used in this work have been described previously: pCDNA3, flag-Tat, pflag-CTIP2, pDsRed-Tat, pRFP-CTIP2, pLTR-Luc, pCMV-Renilla (Cherrier et al., 2013; Marban et al., 2007; Rohr et al., 2003). pNL4-3.Luc.E- was obtained by the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS from Dr. N. Landau (Connor et al. Virology 1994). UBC9, shUBC9, HA-SUMO1, HA-SUMO2 and HA-SUMO3 plasmids were provided by Dr Virginie Gautier from CEPHR laboratory, UCD, Ireland. GFP-UBC9 plasmid was provided by Dr Frédérique Tesson of the University of Ottawa, Canada.

Cell culture :

Human microglial cell line provided by M Tardieu (Janabi et al 1995), CHME5-HIV cell line provided by J Karn (Wires E et al. 2012) and HEK 293 T cell line were cultivated in Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplied with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum and 100U/mL of penicillin/streptomycin.

Luciferase assays :

Human microglial cells cultivated in 48-wells plates were transfected in triplicate with the indicated vectors using PEI reagent. 48 hours post-transfection cells were collected and luciferase activities were quantify using Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega). pCMV-Renilla luciferase vector was used to normalize final results. Values correspond to an average of independent experiments performed in triplicates.

SDS-PAGE and Western Blot assays :

HEK 293T cells cultivated in 100mm diameter dishes were transfected using calcium phosphate method or PEI reagent with the indicated vectors. If indicated, cells were treated with 10µM of MG132 (Enzo) 4 hours before harvesting cells. 48 hours post-transfection, nuclear proteins were extracted using buffer 1 (10mM HEPES pH7.5 ; 10mM KCl ; 0,5% NP40 ; 0,1mM EDTA ; 1mM DTT ; 0,5mM PMSF) and buffer 2 (20mM HEPES pH 7.5 ; 400mM NaCl ; 1mM EDTA ; 1mM DTT ; 1mM PMSF) on ice and complemented with protease inhibitors. If indicated, SUMO protease inhibitors were added when proteins were extracted. SDS-PAGE were performed using standard

protocols. Protein were immunodetected using antibodies directed against UBC9 (Bd Science, 610749), M2 flag (Sigma, F1804), HDAC1 (Abcam, Ab7028), CTIP2 (Bethyl, A300-383), RNF4 (Abcam, ab230438), Kap1 (Abcam, Ab10483), HA (Biolegend, 901 501) β -actin (A1978 Sigma or 2Q1055 Santa Cruz), Lamin B1 (B-10, Santa Cruz). Proteins were visualized using SuperSignal™ West Dura or SuperSignal™ West Femto Chemiluminescence Detection System (Thermo Fisher) with the imager Fusion FX Vilber.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) :

CHME5-HIV cells containing HIV-1 provirus deleted from Gag were cultivated in 150-mm-diameter dishes. 24 hours before processing ChIP experiment, cells were treated or mock treated (dms0) with 17,5nM of romidepsin (Sigma) to reactivated HIV-1 expression. 48 hours after seeding, cells were fixated with 1% of PFA 10 minutes. The chromatin was sonicated (Bioruptor Plus, Diagenode) 50 min (30sec ON / 30sec OFF) to obtain DNA fragments of 500bp. Chromatin immunoprecipitations were performed with 100 μ g of chromatin and 5 μ g of antibodies IgG Rb (Sigma, I8140), H3 (Abcam, Ab12079), CTIP2 (Bethyl, A300-383), SUMO1 (Abcam, Ab32058), SUMO2/3 (Merck, 072167). IgG was used as a control for immunoprecipitation. After elution, DNA was purified using Phenol/Chloroform/IAA pH8 protocol (P2069, Sigma Aldrich®). The presence of proteins of interest at the HIV-1 promoter was detected using qPCR (SsoAdvanced™ Universal SYBR® BioRad) with 5'LTR primers. Results are presented as percentages of immunoprecipitated DNA compared to the input DNA (%input).

mRNA quantification :

Total RNA were extracted from transfected HEK 293 T cells using Trizol® according to the manufacturer's protocol. mRNA were treated with DNase (Turbo DNase, AM2238 Life Technologies) reverse transcribed into cDNA using iScript™ RT Supermix (BioRad). qPCR were then performed using SYBR Green (SsoAdvanced™ Universal SYBR® BioRad). Primers used in the RT-qPCR are available in Supplementary Data and data were normalized to GAPDH.

Cytotoxicity Assays :

Cells were cultivated in 96-wells plate, 24 hours after seeding, cells were treated with the indicated molecules. At the end of the treatment, 10 μ L of 12mM MTT (Thermofisher

Invitrogen M6494) were added to cells and incubated 4 hours at 37°C 5% CO₂. After incubation, a mix of 100µL 100 % isopropanol and 4µL HCL 1M was added per well. Plate was incubated 30min at 37°C and absorbance was read at 550nm. The positive control (viability) is composed of cells in DMEM and the negative control (mortality) is composed of cells treated with 100% of DMSO. Results are compared to the positive control which correspond to 100% of viability.

Reactivation assays :

CHEM5-HIV cells were used to perform these experiments. These latent microglial cells contain HIV-1 provirus deleted from Gag and the reporter gene GFP integrated into the HIV-1 genome to follow reactivation (Wires et al., 2012). Cells were cultured in 24-wells plate and the day after seeding, cells were treated as indicated. At the end of the treatments, cells were trypsinized and washed with PBS 1X twice. Percentage of GFP+ cells was determined using flow cytometry (Merck Guava). Synergies were calculated using GFP+ values normalized to DMSO by dividing the effect observed after cotreatment or sequential treatment by the sum of the effects obtained after individual treatments.

co-Immunoprecipitation :

HEK 293T cells cultured in 100mm diameter dishes were transfected using PEI method with the indicated vectors. Nuclear or total protein were extracted 48 hours post-transfection as previously described in WB assays. Protein extracts were incubated overnight at 4°C with the following antibodies RNF4 (Abcam, ab230438), UBC9 (Bd Science, 610749) and with magnetic beads (Invitrogen). The day after, coated beads were washed with high-salt (500 mM NaCl) and low salt (125 mM NaCl) buffers. Protein complexes were studied by SDS-PAGE and Western blot as previously described.

Results

UBC9 colocalizes with CTIP2

Protein partners of CTIP2 were previously identified by co-immunoprecipitations followed by quantitative mass spectrometry analysis. This analysis identified a connection between CTIP2 and the SUMO pathway (Fig. 1). Surprisingly, no UBC9 peptides were detected associated with CTIP2. We then performed confocal

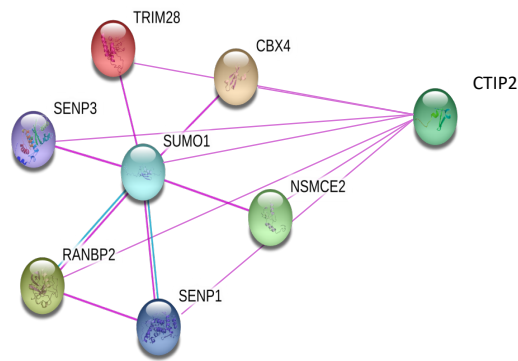


Figure 1 : CTIP2 is associated with different members of the SUMO pathway.

CTIP2 partners were identified by quantitative mass spectrometry analysis performed on CTIP2-associated factors purified by co-immunoprecipitation with CTIP2. Presented proteins have been significantly enriched ($p < 0,05$) more than two folds relative to the control IP.

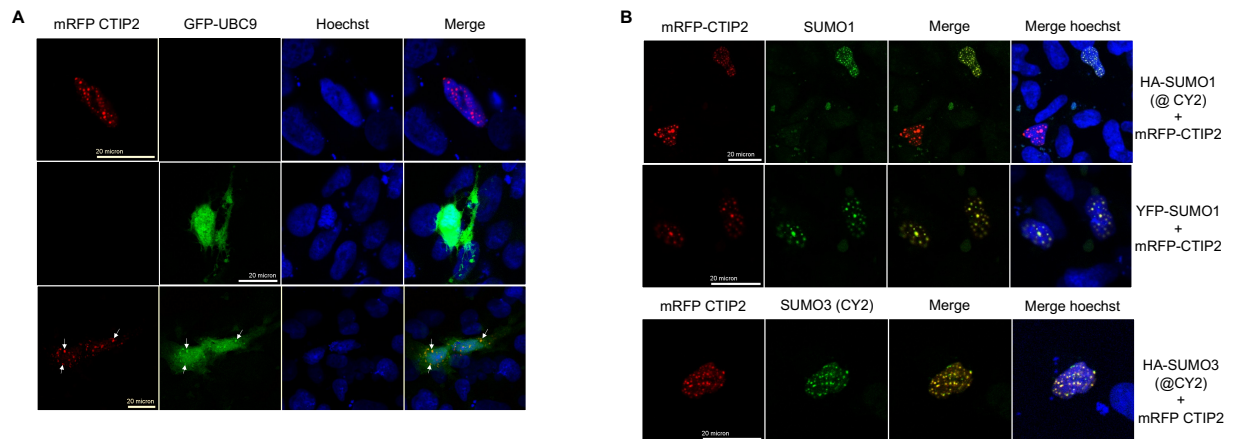


Figure 2 : CTIP2 relocates UBC9 and colocalizes with SUMO1 and SUMO3. (A, B) Microglial cells were transfected with the indicated vectors. 24 hours post-transfection, cells were fixed with 4% PFA, nuclei were stained with Hoechst and cells incubated with the indicated fluorescent antibodies. Images were taken using a Leica SPE confocal microscope.

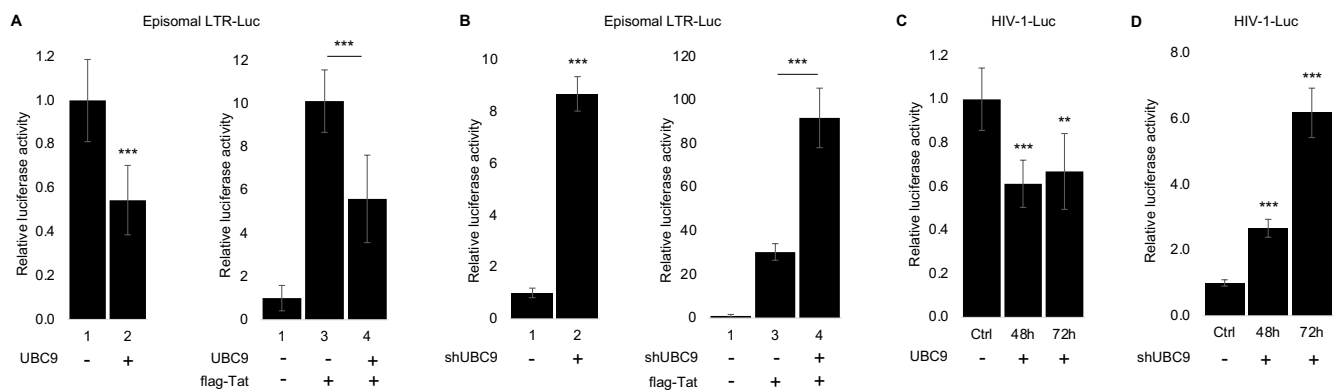


Figure 3 : UBC9 represses HIV-1 transcription and expression. (A-D) Microglial cells were transfected with (A, B) the episomal vector LTR-firefly luciferase or (C, D) the PNL4.3ΔENV-Luc vectors and with the expression vector UBC9 or shUBC9 or flag-Tat. (A, B, C) 48 hours or (D) 72 hours post-transfection luciferase activities were quantified using the *Dual-Glo kit Promega*[®]. Firefly luciferase values were normalized to renilla luciferase values and results are presented relative to the control condition taken as one. Statistic T-tests were performed, p-value : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Efficiency of UBC9 overexpression and downregulation has been control in figure 6.

microscopy analysis to localize CTIP2 and UBC9 in microglial cells nuclei. Microglial cells were transfected with mRFP-CTIP2 and GFP-UBC9 constructs alone and together (Fig. 2A). Alone, UBC9 was distributed in the cytoplasm and the nucleus of cells. In contrary, CTIP2 proteins were concentrated in characteristic nuclear and dense structures (Marban et al., 2007; Rohr et al., 2003). Interestingly, in GFP-UBC9 and RFP-CTIP2 expressing cells partial relocations of UBC9 in CTIP2-induced structures were observed (Fig. 2A merge panel). We next investigated whether CTIP2 and the SUMOylation marks SUMO1 and SUMO3 colocalize (Fig. 2B). As shown, mRFP-CTIP2 colocalised with YFP-SUMO1 (Fig. 2B upper panel) and HA-tagged SUMO1 and SUMO3 (Fig. 2B lower panel). These observations suggested a link between CTIP2 and the SUMO pathway.

UBC9 represses HIV-1 gene transcription and viral replication.

Previous studies clearly established that the SUMO pathway can have a negative impact on transcription (review in (Rosonina et al., 2017)). Since UBC9 is the main actor of the SUMOylation mechanism, we first investigated the impact of this Post Translational Modification (PTM) by looking at the influence of UBC9 on HIV-1 expression. To assess this question, we performed luciferase assays in UBC9 overexpressing and UBC9 depleted microglial cells (Fig. 3). UBC9 overexpression (Fig. 3A) and UBC9 depletion (Fig. 3B) respectively inhibited and stimulated the HIV-1 promoter in the absence and in the presence of Tat. We next studied the influence of UBC9 on the HIV-1 provirus PNL4.3ΔENV-Luciferase. As expected, UBC9-mediated repression of HIV-1 gene transcription coherently affected the viral expression (Fig. 3C). Indeed, HIV-1 expression levels were inversely correlated with UBC9 expression levels. Of note, UBC9 overexpression and depletion efficiencies were analysed by western blot analysis as shown in Figure 6. Altogether these results suggest that UBC9 and thereby the SUMO pathway may contribute to HIV-1 latency.

Inhibiting the SUMO pathway with the SUMO-inhibitor tannic acid increases HIV-1 gene transcription and viral expression.

To assess the importance of SUMOylation on HIV-1 gene expression, we took the

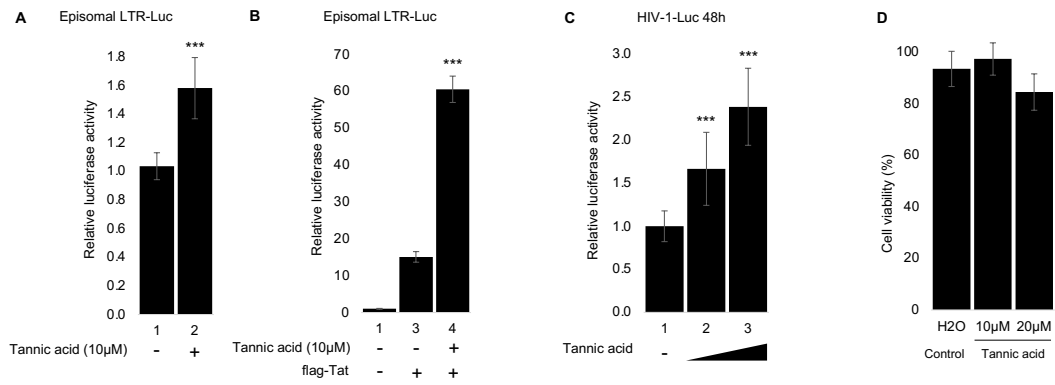


Figure 4 : Inhibition of the SUMO pathway with tannic acid increases HIV-1 transcription and expression. (A-C) Microglial cells were transfected with (A, B) the episomal vector LTR-firefly luciferase or (C) the PNL4.3ΔENV-Luc vector and (B) the expression vector flag-Tat. 24 hours post-transfection, cells were treated with (A, B) 10μM or (C) 10 or 20μM of tannic acid (TA). 48 hours post-transfection, luciferase activities were quantified using the *Dual-Glo kit Promega*[®]. Firefly luciferase values were normalized to renilla luciferase activities and results are presented relative to the control condition taken as one. Statistic T-tests were performed, p-value : * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. (D) To assess that TA is not toxic for cells, cytotoxic assays were performed. 24 hours after seeded cells in 96 wells plate, cells were treated with 10 or 20μM of TA. 24 hours post-treatment, MTT reagent (Invitrogen) was added to cells. Results obtained for TA were compared to viability control (cells with media). Values obtained for the positive control are equal to 100% of cell viability. Control condition, treatment with media and vehicle which is water.

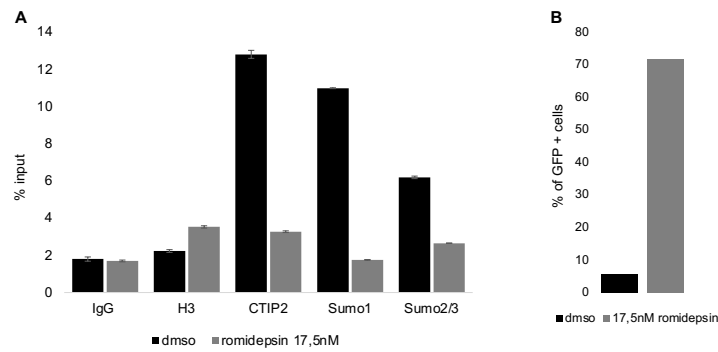


Figure 5 : SUMO marks are recruited to the latent HIV-1 promoter. (A) Microglial cells latently infected with HIV-1 containing the GFP reporter gene (CHME5-HIV) were mock treated or reactivated by using romidepsin 17,5 nM during 24 hours. Cells were subjected to ChIP-qPCR experiments targeting the binding of the indicated proteins to the HIV-1 5'LTR promoter. Results shown are indicative of a single representative experiment and qPCR experiments were performed in triplicates. (B) A sample of the same CHME5-HIV cells for both conditions was collected before proceeding to ChIP to analyze GFP expression by flow cytometry.

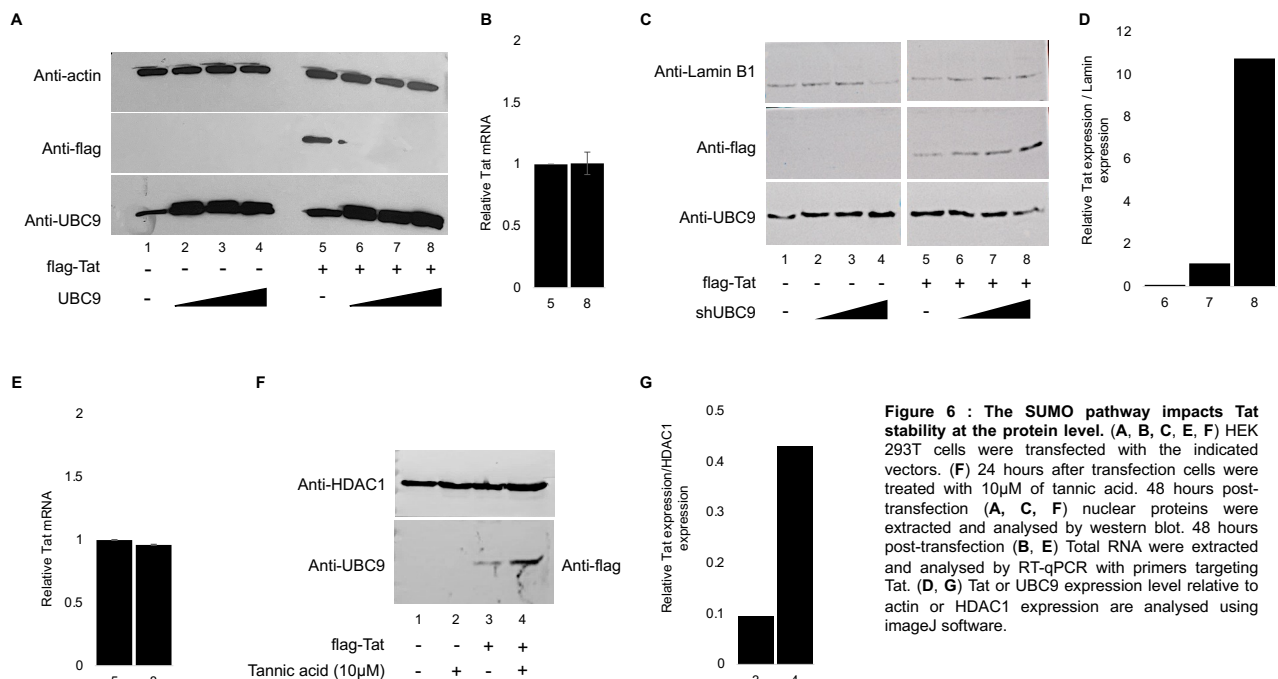


Figure 6 : The SUMO pathway impacts Tat stability at the protein level. (A, B, C, E, F) HEK 293T cells were transfected with the indicated vectors. (F) 24 hours after transfection cells were treated with 10μM of tannic acid. 48 hours post-transfection (A, C, F) nuclear proteins were extracted and analysed by western blot. 48 hours post-transfection (B, E) Total RNA were extracted and analysed by RT-qPCR with primers targeting Tat. (D, G) Tat or UBC9 expression level relative to actin or HDAC1 expression are analysed using imageJ software.

advantage of the SUMO inhibitor (SUMOi) Tannic Acid (TA) (Suzawa et al., 2015) to analyse the impact of a repressed SUMO pathway on HIV-1 expression. Since TA treatment promoted a modest but significant stimulation of the HIV-1 promoter in the absence of Tat (Fig. 4A), TA strongly stimulated Tat-mediated transactivation (Fig. 4B). As consequence of these transcriptional activations, TA also stimulated the HIV-1 expression (Fig. 4C). As shown on Figure 4D, TA was not toxic at the used concentrations. These results confirmed the contribution of the SUMO pathway in the control of HIV-1 latency and raised the possibility to use SUMOi to reactivate latently integrated virus as part of the Shock and Kill strategy.

SUMO marks are recruited to the latent HIV-1 promoter.

In microglial cells, HIV-1 latency is established by the recruitment of chromatin modifier enzymes via CTIP2. To assess whether the SUMO marks are present on the latently integrated HIV-1 promoter, we performed ChIP-qPCR experiments in the CHME5-HIV microglial model of latency. SUMO1, SUMO2/3 and CTIP2 were found bound to the latent HIV-1 promoter but not to the promoter reactivated by a romidepsin treatment (Fig. 5A). As a control, percentage of reactivated cells after the romidepsin treatment has been analysed by flow cytometry (Fig. 5B). These results suggest that SUMO marks are associated to the latently integrated HIV-1 promoter and contribute to viral gene silencing.

The SUMO pathway is involved in the degradation of the HIV-1 Tat protein via the proteasome pathway

HIV-1 Tat protein is a key transactivator of viral gene transcription. In the following experiments, we analysed the impact of UBC9 expression levels and the influence of tannic acid on Tat expression. We report that UBC9 overexpression induced a depletion of Tat in HEK cells (Fig. 6A). RT-qPCR analysis of Tat mRNA indicated that UBC9 expression did not repress mRNA expression (Fig. 6B) suggesting that UBC9-mediated depletion of Tat occurred at the protein level. In line with these results, knocking down UBC9 promoted Tat expression (Fig. 6C, D) without any detectable impact on the HIV-1 Tat mRNA (Fig. 6E). We next treated Tat expressing cells with

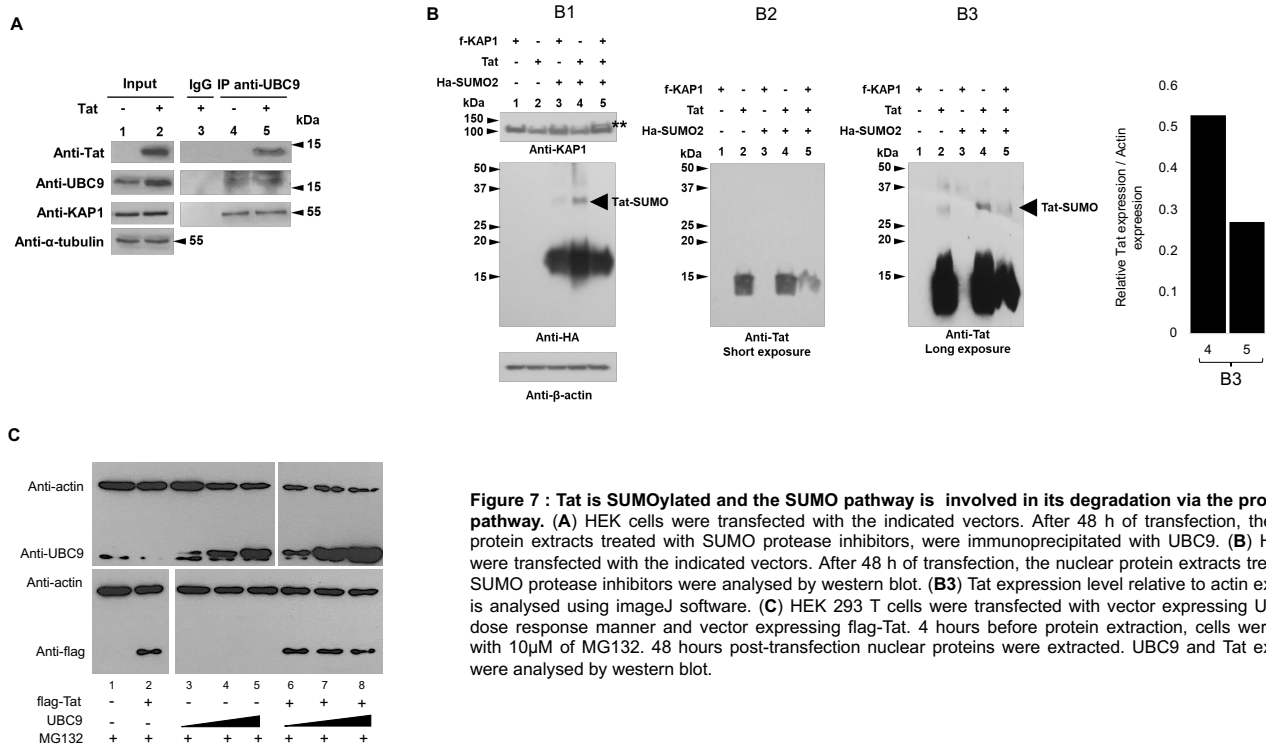


Figure 7 : Tat is SUMOylated and the SUMO pathway is involved in its degradation via the proteasome pathway. (A) HEK cells were transfected with the indicated vectors. After 48 h of transfection, the nuclear protein extracts treated with SUMO protease inhibitors, were immunoprecipitated with UBC9. (B) HEK cells were transfected with the indicated vectors. After 48 h of transfection, the nuclear protein extracts treated with SUMO protease inhibitors were analysed by western blot. (B3) Tat expression level relative to actin expression is analysed using imageJ software. (C) HEK 293 T cells were transfected with vector expressing UBC9 in a dose response manner and vector expressing flag-Tat. 4 hours before protein extraction, cells were treated with 10μM of MG132. 48 hours post-transfection nuclear proteins were extracted. UBC9 and Tat expression were analysed by western blot.

10 μ M of TA during 24 hours. TA treatment increases Tat expression (Fig. 6F, G) confirming that the effects observed upon UBC9 depletions resulted from reduced SUMOylation events. These results further suggested that Tat expression may be regulated by SUMOylation. First, we analysed whether UBC9, KAP1 an E3-ligase and Tat interacted in cells nuclei (Fig. 7A). Nuclear extracts from Tat expressing cells were subjected to co-immunoprecipitations targeting endogenously expressed UBC9 and KAP1 (Fig. 7A). As shown, Tat, UBC9 and KAP1 co-immunoprecipitated suggesting that Tat may be a target for the SUMO pathway. To investigate this point we analysed the SUMOylation of Tat in cells expressing HA-SUMO2 to allow a better detection of the SUMO mark. As expected, HA-SUMO2 protein is detectable just above 15 kDa (Fig. 7B1). Interestingly, a signal corresponding to the expected size of HA-SUMO2-Tat is detectable upon expression of HA-SUMO2. Immunodetections of Tat confirmed the presence of HA-SUMO2 Tat (Fig. 7B3 column 4) but also suggested the presence of SUMOylated forms of Tat in the absence of HA-SUMO2 (Fig. 7B3 column 2). As we previously described by our lab, KAP1 promoted Tat degradation making it barely detectable (Fig. 7B3 column 5). The quantity of SUMO-Tat in the absence or presence of KAP1 (Fig. 7B3 histogram) suggests that KAP1 promotes Tat-SUMOylation before its degradation. Next to further study the link between Tat-SUMOylation and its degradation we analysed the effect of UBC9 in the presence of the proteasome inhibitor MG132 (Fig. 7C). Since UBC9 overexpression induced the depletion of Tat (Fig. 6A), MG132 treatment impaired this UBC9-mediated degradation of Tat. These results suggested that SUMOylation contributes to the regulation of Tat protein degradation.

HDACi and SUMOi cooperate to reactivate latent HIV-1 from latency

Persistence of latently integrated viruses in reservoirs is one of the major block toward an HIV cure. New strategies emerged to eliminate, reduce or deeply inhibit these reservoirs. One of them is the Shock and Kill strategy which aims to reactivate latent cells by combining treatments with latency reactivated agents (LRAs) (Shock) and specific stimulations of the immune system (Kill) in a context of cART. Here we tested three SUMOi (ML792, TA and 2D08) alone or in combination with HDACi (Romidepsin and SAHA) on the CHME5-HIV microglial model of HIV-1 latency. Since TA and 2D08 treatments had no impact on the latent provirus, treatments with increasing

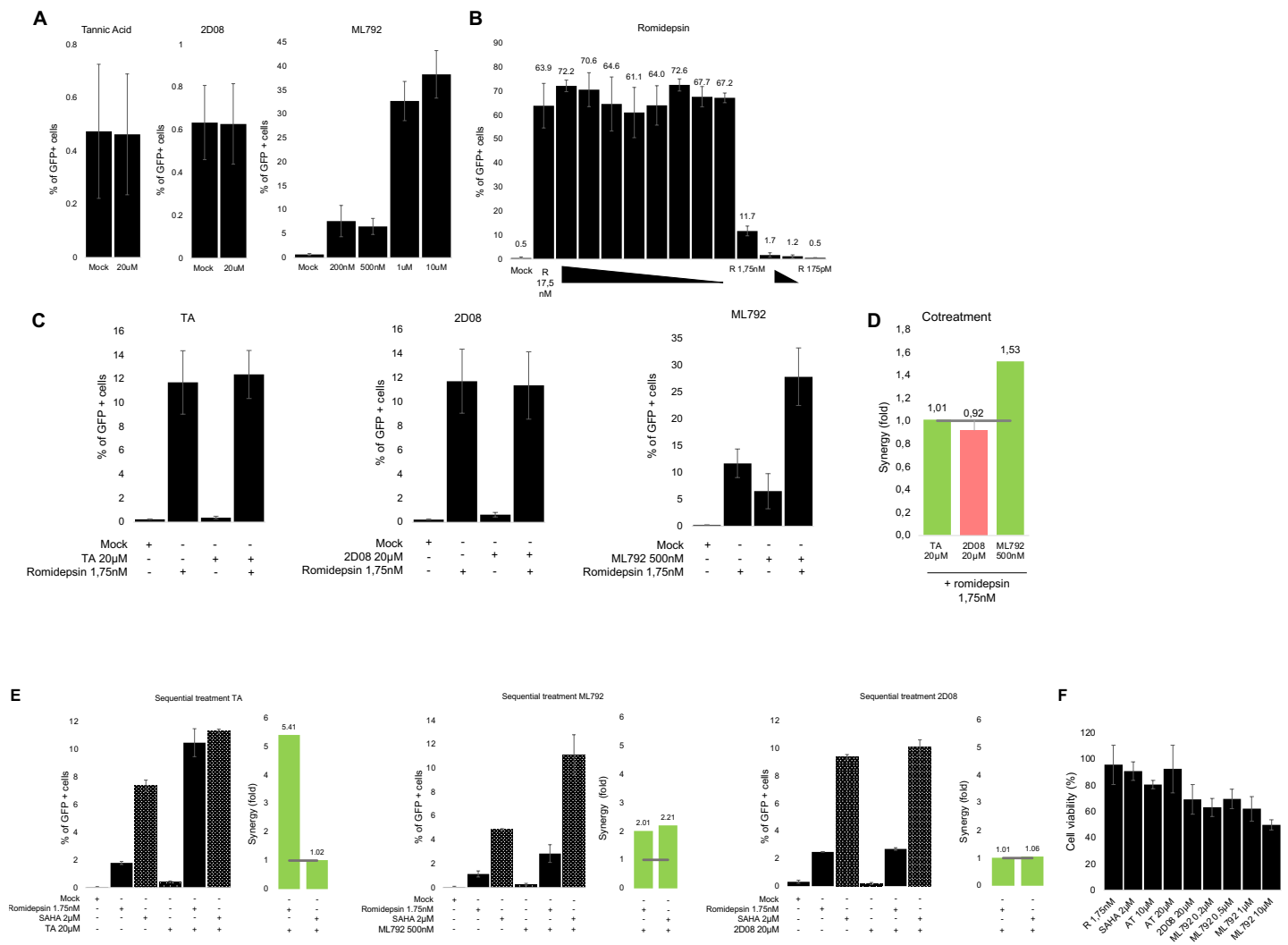


Figure 8 : HDACi and SUMOi act synergistically to increase HIV-1 production. CHME5-HIV cells harbor latent HIV-1 provirus containing *gfp* gene. Cells were mock treated or treated with HDACi (romidepsin or SAHA), SUMOi (tannic acid (TA), 2D08 or ML792) alone or in combination as indicated. 24 hours after the last treatment, cells were analyzed by flow cytometry to quantify the proportion of cells expressing GFP. Sample were performed in duplicate and a representative experiment from two is represented. Cells were treated (A) with SUMOi alone for 24 hours and (B) optimal romidepsin concentration was determined. Cells were (C) co-treated with SUMOi and romidepsin for 24 hours and (D) synergy was calculated. Cells were (E) first treated during 24 hours with SUMOi then treated with 1,75nM romidepsin or 2uM SAHA and synergy was calculated. For each combinatory treatment, the fold-synergy was calculated by dividing the effect observed after co-treatments or sequential treatment by the sum of the effects obtained after the individual treatments. (F) Cytotoxicity of the different treatment was assess using MTT cytotoxicity test.

concentrations of the SUMOi, ML792 promoted robust reactivations of HIV-1 expression from latency with a moderate cytotoxicity (Fig. 8A, F). For the next experiments, we selected the suboptimal 500nM concentration of ML792 to study the synergy with the HDACi, romidepsine and SAHA. We first determined an adequate concentration of romidepsine. As shown, romidepsin treatments promoted impressive reactivations of HIV-1 expression in microglial cells. For treatments that combine romidepsin with SUMOi, we choose 1.75nM that promoted a suboptimal reactivation with no cytotoxicity (Fig. 8B, F). Since co-treatment with TA and 2D08 did not influence the romidepsin-mediated reactivations, ML792 treatment promoted a synergistic activation of the latent provirus (Fig. 8C, D). We have previously described that the time schedule influences the efficiency of LRAs (Bouchat et al., 2016). We sequentially treated cells with SUMOi and HDACi. Cells were first treated with the SUMOi during 24h and subjected to additional treatments with 1,75nM of romidepsin or 2µM of SAHA for 24 supplementary hours. Since no synergistic reactivation was observed with 2D08 (Fig. 8E, 2D08 panel), synergic reactivations were observed for sequential treatments with TA + romidepsin but not with the TA + SAHA (Fig. 8E, TA panel). Interestingly, synergistic reactivations were observed for the treatments combining ML792 with both HDACi (Fig. 8E, ML792 panel).

Discussion

The introduction of antiretroviral therapy has raised hopes for curing patients infected with HIV-1. Unfortunately, long-term suppression of HIV-1 replication has unveiled the existence of latent HIV-1 reservoirs. Microglial cells, the CNS-resident macrophages, are major targets for HIV-1 and constitute the CNS reservoir of latently infected cells. We previously reported that the cellular cofactor CTIP2 favours the establishment and the persistence of latency by recruitments of repressive complexes at the latent HIV-1 promoter. In addition, we have shown that the E3 ligase KAP1 cooperates with CTIP2 to repress HIV-1 gene transcription (Ait-Ammar et al., 2021) suggesting a link between the SUMO pathway and viral latency. In this study, the presented confocal microscopy experiments suggested an *in vivo* interaction between the SUMO pathway and CTIP2. Indeed, our results showed that UBC9 partially colocalized with CTIP2. These observations are consistent with the colocalization of CTIP2 with SUMO1 and SUMO2/3. Our results are consistent with previous reports demonstrating that CTIP2

is SUMOylated by SUMO1 (Tirard et al., 2012) on Lysin 679 (Dubuissez et al., 2016; Zhang et al., 2012). CTIP2 contains a PDSM motif which enhances CTIP2 SUMOylation when phosphorylated (Hietakangas et al., 2006). In unstimulated primary human CD4+T cells from healthy donors, CTIP2 is bound with MTA1 and the NuRD complex to repress transcription of target genes. However, upon activation, phosphorylation of Ser2 disrupt the interaction with MTA1 and the NuRD repressive complexes. In T cells, CTIP2 SUMOylation allows the recruitment of P300 and activates transcription. Phosphorylation and SUMOylation modulate CTIP2 activity, switching it from a transcriptional repressor to a transcriptional activator. Interestingly a study focused on the control of epidermal proliferation and terminal differentiation during epidermal development demonstrated that CTIP2 SUMOylation induced its degradation via the proteasomal pathway. We show that CTIP2 and SUMO marks are associated with the silenced HIV-1 promoter in microglial cells. In addition, stimulation of HIV-1 gene transcription released these marks from the HIV-1 promoter. Moreover, modulations of the SUMO pathway did not affect CTIP2 expression (results not shown). To further decipher the role of the SUMO pathway on the HIV-1 expression, we quantified the influence of UBC9 and TA on HIV-1 gene transcription and viral expression. Our results demonstrate for the first time that UBC9 and SUMOylation negatively impacts HIV-1 gene transcription.

The viral protein Tat is crucial for HIV-1 gene transcription and viral expression. We next studied the effect of SUMOylation on Tat function and Tat expression. Our results demonstrated that UBC9 represses Tat-mediated transactivation via its degradation by the proteasome pathway. TA treatments confirmed that the observed degradation of Tat is mediated by SUMOylations. Finally, we could observe SUMOylated forms of Tat in the presence of SUMO protease inhibitors for the first time. It seems that KAP1 overexpression decreases the immunodetection of the SUMO-Tat forms. This observation can be explained by the increase of Tat SUMOylation via KAP1 and finally Tat degradation. Our analysis of Tat expression in MG132 treated cells allows to conclude that UBC9 and the SUMO pathway favor its degradation via the proteasome pathway. These experiments are consistent with our previous report demonstrating that the E3 ligase KAP1 interacts and colocalizes with Tat to promote its degradation via the proteasome pathway. Different studies have shown that SUMOylation and proteasomal degradation are linked by the ubiquitination pathway. The SUMO-

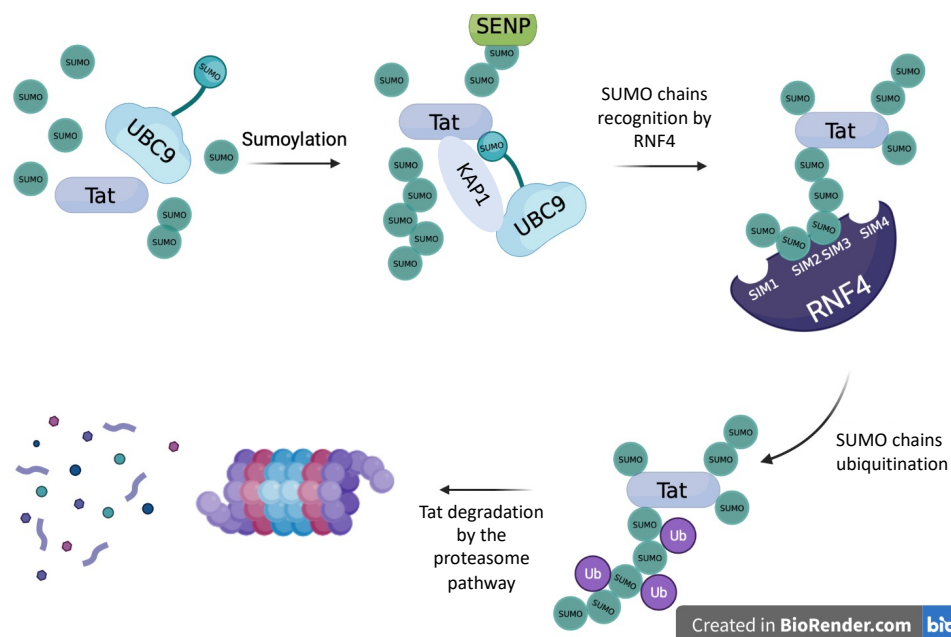


Figure 9 : Tat degradation hypothesis

targeted ubiquitin E3 ligase RNF4, has SUMO-interaction motifs that recognize SUMO-chains and a RING domain that allows ubiquitination. RNF4 recognizes SUMOylated proteins and targets them for proteasomal degradation. We hypothesize that RNF4 could be the link between Tat degradation, SUMOylation and the proteasome pathway (Fig. 9). Our next experiments will attempt to demonstrate this link. However, altogether, our results demonstrate the involvement of the SUMO pathway in the control of HIV-1 latency. Mechanistically, the control of Tat function is crucial for the persistence of the latently integrated virus. The SUMO-mediated control of Tat expression may therefore contribute to the persistence of the reservoirs. However, the impacts of UBC9 modulations on the activity of the viral promoter and the presence of SUMO marks on the silenced promoter suggest that SUMOylation may also contribute to the establishment of latency.

HIV-1 cure is still not reached since viruses remain in reservoirs despite antiretroviral therapy. Eliminating or reducing reservoirs could achieve this goal. One of the strategies to achieve it is the Shock and Kill strategy. LRAs need to promote the “shock” that reactivates latently integrated viruses and the “kill” needs to sharpen the immune system to allow elimination of the reactivated cells. Antiretroviral therapy is kept during the process to avoid new infections. We tested the efficiency of SUMO inhibitors in reactivating latent HIV-1 in microglial cells. ML792 is an interesting SUMOi which targets E1 enzyme (SAE) and completely blocks SUMOylation (He et al., 2017). Treatment with ML792 alone, in co-treatment with romidepsin or sequential treatment with SAHA and romidepsin robustly reactivated HIV-1 expression in a synergistic manner. In addition, TA and romidepsin act synergistically to reactivate HIV-1 expression. These experiments demonstrate that SUMOylation should be considered as an additional level of regulation in HIV-1 transcription. SUMOi should be considered in the investigation of new LRAs and taken into account in studies combining LRAs to synergistically reactivate HIV. In conclusion our study demonstrated the role of the SUMOylation in HIV-1 gene silencing and therefore in viral latency. New investigations will be needed to evaluate SUMOi potential to reactivate HIV from reservoirs of cART-treated patients. In addition, future studies will be needed to investigate the intimate mechanisms regulating Tat SUMOylation in other HIV-1 target cell types.

Bibliography :

Ait-Ammar, A., Bellefroid, M., Daouad, F., Martinelli, V., Van Assche, J., Wallet, C., Rodari, A., De Rovere, M., Fahrenkrog, B., Schwartz, C., et al. (2021). Inhibition of HIV-1 gene transcription by KAP1 in myeloid lineage. *Sci. Rep.* **11**, 2692.

Avalos, C.R., Abreu, C.M., Queen, S.E., Li, M., Price, S., Shirk, E.N., Engle, E.L., Forsyth, E., Bullock, B.T., Mac Gabhann, F., et al. (2017). Brain Macrophages in Simian Immunodeficiency Virus-Infected, Antiretroviral-Suppressed Macaques: a Functional Latent Reservoir. *MBio* **8**, e01186-17.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–871.

Barré-Sinoussi, F., Ross, A.L., and Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 877–883.

Bouchat, S., Delacourt, N., Kula, A., Darcis, G., Driessche, B.V., Corazza, F., Gatot, J.-S., Melard, A., Vanhulle, C., Kabeya, K., et al. (2016). Sequential treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and deacetylase inhibitors reactivates HIV-1. *EMBO Mol. Med.* **8**, 117–138.

Cherrier, T., Douce, V.L., 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.* **110**, 12655–12660.

Chun, T.W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A., and Fauci, A.S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13193–13197.

Davey, R.T., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T.W., Metcalf, J.A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R.A., Adelsberger, J.W., Miller, K.D., et al. (1999). HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 15109–15114.

Dubuissez, M., Loison, I., Paget, S., Vorng, H., Ait-Yahia, S., Rohr, O., Tscopoulos, A., and Leprince, D. (2016). PKC-mediated phosphorylation of BCL11B at Serine 2 negatively regulates its interaction with NuRD complexes during CD4+ T cell activation. *Mol. Cell. Biol. MCB*.00062-16.

Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., et al. (1997). Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Science* **278**, 1295–1300.

Gama, L., Abreu, C.M., Shirk, E.N., Price, S.L., Li, M., Laird, G.M., Pate, K.A.M., Wietgreffe, S.W., O'Connor, S.L., Pianowski, L., et al. (2017). Reactivation of simian immunodeficiency virus reservoirs in the brain of virally suppressed macaques. *AIDS Lond. Engl.* **31**, 5–14.

García, F., Plana, M., Vidal, C., Cruceta, A., O'Brien, W.A., Pantaleo, G., Pumarola, T., Gallart, T., Miró, J.M., and Gatell, J.M. (1999). Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS Lond. Engl.* **13**, F79-86.

Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 947–956.

He, X., Riceberg, J., Soucy, T., Koenig, E., Minissale, J., Gallery, M., Bernard, H., Yang, X., Liao, H., Rabino, C., et al. (2017). Probing the roles of SUMOylation in cancer cell biology by using a selective SAE inhibitor. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 1164–1171.

Hendriks, I.A., and Vertegaal, A.C.O. (2016). A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 581–595.

Hietakangas, V., Ankar, J., Blomster, H.A., Fujimoto, M., Palvimo, J.J., Nakai, A., and Sistonen, L. (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 45–50.

Honeycutt, J.B., Thayer, W.O., Baker, C.E., Ribeiro, R.M., Lada, S.M., Cao, Y., Cleary, R.A., Hudgens, M.G., Richman, D.D., and Garcia, J.V. (2017). HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy. *Nat. Med.* **23**, 638–643.

Ko, A., Kang, G., Hattler, J.B., Galadima, H.I., Zhang, J., Li, Q., and Kim, W.-K. (2019). Macrophages but not Astrocytes Harbor HIV DNA in the Brains of HIV-1-Infected Aviremic Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* **14**, 110–119.

Lamers, S.L., Salemi, M., Galligan, D.C., Morris, A., Gray, R., Fogel, G., Zhao, L., and McGrath, M.S. (2010). Human immunodeficiency virus-1 evolutionary patterns associated with pathogenic processes in the brain. *J. Neurovirol.* **16**, 230–241.

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.

Letendre, S., Marquie-Beck, J., Capparelli, E., Best, B., Clifford, D., Collier, A.C., Gelman, B.B., McArthur, J.C., McCutchan, J.A., Morgello, S., et al. (2008). Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch. Neurol.* **65**, 65–70.

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., Walque, S. de, Redel, L., Lint, C.V., Aunis, D., and Rohr, O. (2007). Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J.* 26, 412–423.

Mata, R.C., Vician, P., de Alarcón, A., López-Cortés, L.F., Gómez-Vera, J., Trastoy, M., and Cisneros, J.M. (2005). Discontinuation of antiretroviral therapy in patients with chronic HIV infection: clinical, virologic, and immunologic consequences. *AIDS Patient Care STDs* 19, 550–562.

Rao, V.R., Ruiz, A.P., and Prasad, V.R. (2014). Viral and cellular factors underlying neuropathogenesis in HIV associated neurocognitive disorders (HAND). *AIDS Res. Ther.* 11, 13.

Réu, P., Khosravi, A., Bernard, S., Mold, J.E., Salehpour, M., Alkass, K., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., et al. (2017). The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Rep.* 20, 779–784.

Rohr, O., Lecestre, D., Chasserot-Golaz, S., Marban, C., Avram, D., Aunis, D., Leid, M., and Schaeffer, E. (2003). Recruitment of Tat to heterochromatin protein HP1 via interaction with CTIP2 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in microglial cells. *J. Virol.* 77, 5415–5427.

Rosonina, E., Akhter, A., Dou, Y., Babu, J., and Sri Theivakadacham, V.S. (2017). Regulation of transcription factors by sumoylation. *Transcription* 8, 220–231.

Salemi, M., Lamers, S.L., Yu, S., Oliveira, T. de, Fitch, W.M., and McGrath, M.S. (2005). Phylodynamic Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Distinct Brain Compartments Provides a Model for the Neuropathogenesis of AIDS. *J. Virol.* 79, 11343–11352.

Sutherland, E.J., and Brew, B.J. (2018). Human Immunodeficiency Virus and the Nervous System. *Neurol. Clin.* 36, 751–765.

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, e09003.

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.* 109, 21122–21127.

Wallet, C., De Rovere, M., Van Assche, J., Daouad, F., De Wit, S., Gautier, V., Mallon, P.W.G., Marcello, A., Van Lint, C., Rohr, O., et al. (2019). Microglial Cells: The Main HIV-1 Reservoir in the Brain. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9.

Whitney, J.B., Hill, A.L., Sanisetty, S., Penaloza-MacMaster, P., Liu, J., Shetty, M., Parenteau, L., Cabral, C., Shields, J., Blackmore, S., et al. (2014). Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature* 512, 74–77.

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-κB) and induces human immunodeficiency virus (HIV) transcription in human microglial cells. *J. Neurovirol.* 18, 400–410.

Wong, J.K., Hezareh, M., Günthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Spina, C.A., and Richman, D.D. (1997). Recovery of Replication-Competent HIV Despite Prolonged Suppression of Plasma Viremia. *Science* 278, 1291–1295.

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.

Discussion

L'infection par le VIH-1 reste à l'heure actuelle une infection chronique. Le traitement des patients par les antirétroviraux a considérablement amélioré leur prise en charge mais ne permet pas d'éliminer le virus de leur organisme. En effet, ce traitement ne cible pas les virus latents des réservoirs qui sont la principale cause du rebond de la virémie observé à l'arrêt des ARV. Ainsi, il est désormais clairement établi que pour éliminer le VIH-1 de l'organisme des patients infectés, les réservoirs doivent être ciblés pour les supprimer ou au minimum pour réduire significativement leur taille. Plusieurs nouvelles stratégies thérapeutiques ont donc émergé dans le but d'éliminer ces cellules infectées latentes. Ces stratégies se basent notamment sur le modèle du petit nombre de patients infectés par le VIH-1 appelés contrôleurs élités. Ils arrivent à maintenir leur virémie sous les niveaux de détection et ceci sans traitement antirétroviral (pour revue (Deeks and Walker, 2007)). Une autre étude a identifié 14 patients appelés contrôleurs post-traitement, qui contrôlent leur virémie pendant plusieurs années après l'arrêt des ARV. Chez ces patients, le traitement a été initié très rapidement après leur infection et a été suivi pendant plusieurs années (Sáez-Cirión et al., 2013). Les contrôleurs élités ainsi que les contrôleurs post-traitement sont un modèle de guérison fonctionnelle. L'étude des caractéristiques de l'infection chez ces patients a permis de définir de nouvelles stratégies de guérison dont la stratégie *Shock and Kill* et la stratégie *Block and Lock*. La première a pour objectif, de réactiver les virus latents via différentes molécules appelées LRAs (*Latency Reactivated Agents*) qui ciblent les mécanismes d'établissement et de maintien de la latence virale dans les cellules réservoirs. La mise en place de la latence virale est principalement due à une répression de la transcription des gènes viraux par différents complexes. Ces derniers permettent notamment le recrutement de marques épigénétiques répressives au niveau du promoteur viral. Ainsi, les LRAs peuvent cibler ces marques épigénétiques ou activer des facteurs cellulaires nécessaires à l'initiation ou à l'élongation de la transcription comme NF- κ B ou encore PTEF-b. Puis le système immunitaire et notamment les lymphocytes T cytotoxiques sont stimulés afin d'éliminer les cellules infectées réactivées. Tout au long du processus, le traitement antirétroviral est maintenu afin d'éviter l'infection de nouvelles cellules par les cellules réactivées. Cependant, cette stratégie présente quelques limites et freins à sa mise en place.

L'hétérogénéité des cellules latentes reflète la multiplicité des mécanismes permettant le maintien de l'état de latence. Ces mécanismes varient probablement d'un patient à l'autre, voire même d'une cellule à l'autre chez un même patient (Sannier et al., 2021). La stratégie *Block and Lock* est une alternative à la première stratégie. Elle a pour but de réprimer totalement de façon permanente la transcription résiduelle observée dans les réservoirs. L'établissement d'une latence profonde pourrait empêcher le rebond viral lorsque les ARV sont supprimés. Cependant, la mise en place de ces stratégies nécessite une connaissance précise des mécanismes qui régissent la latence virale dans les différents réservoirs viraux identifiés à ce jour.

Le laboratoire DHPI a identifié le facteur de transcription cellulaire CTIP2 comme étant un acteur majeur de l'établissement et du maintien de la latence virale dans les cellules microgliales. CTIP2 permet l'établissement de la latence en recrutant au niveau du promoteur du VIH-1 un complexe répresseur. CTIP2 lié aux sites Sp1 du promoteur viral sert de plateforme d'ancrage et recrute HDAC1, HDAC2 et Suv39H1. Les HDACs desacétylent les histones tandis que Suv39H1 génère la triméthylation de H3K9 (H3K9me3). De plus, LSD1 favorise la triméthylation de H3K4 par le complexe hCOMPASS méthyltransférase via le recrutement de hSet1 et WDR5. Ces marques épigénétiques permettent la formation d'hétérochromatine et inhibent la transcription des gènes du VIH-1. Mais CTIP2 permet aussi le maintien de l'état de latence au niveau du promoteur viral en séquestrant le facteur d'élongation PTEF-b dans un complexe inactif. Le complexe 7SK snRNP est recruté au niveau du promoteur via HMGA1. Ce dernier recrute alors CTIP2 associé à PTEF-b inactif et HEXIM1 sur l'ARN 7SK. Ainsi, CTIP2 inhibe l'activité kinase Cdk9 de PTEF-b qui empêche l'activation de l'ARN Pol II et inhibe le recrutement de PTEF-b. CTIP2 étant un acteur central de la latence des cellules microgliales, les projets de notre laboratoire visent à identifier de nouveaux partenaires de CTIP2.

Afin d'infecter efficacement les cellules, les virus, dont le VIH-1, s'emparent de différents mécanismes cellulaires et les détournent dans le but de se répliquer. En réponse à l'infection virale, les cellules infectées développent différents mécanismes faisant notamment intervenir des facteurs de restriction cellulaires qui limitent l'infection. Cependant, afin de contrecarrer cette réponse antivirale, le VIH-1 possède différentes protéines virales accessoires qui inhibent les mécanismes de défenses cellulaires. En effet, Vpu et Nef induisent la déplétion de la tétherine et du CMH-1

ou de CD4 par la dégradation lysosomale de ces protéines. Vif et Vpx manipulent la voie du protéasome pour dégrader les facteurs de restriction cellulaires tels que APOBEC3G et SAMDH1. En revanche, jusqu'à récemment, la fonction de la protéine virale Vpr n'était pas encore entièrement comprise. Vpr est exprimée plus tardivement contrairement à Tat et Rev. Elle est cependant incorporée dans les particules virales afin d'être relargée rapidement lors des premières phases de l'infection. Vpr participe à de nombreuses fonctions dont la transcription inverse, l'import nucléaire du complexe de pré-intégration (PIC) ou encore la transcription du VIH-1. De nombreuses études ont démontré que Vpr pouvait faciliter la réplication du VIH-1 via différents mécanismes. Elle peut notamment induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2, ce qui favorise la transcription des gènes viraux. De plus, Vpr interagit avec Tat et augmente de façon synergique son activité transcriptionnelle au niveau du promoteur du VIH-1 (pour revue (Wallet et al., 2020)). Il a été démontré que Vpr interagit avec DCAF1 du complexe Cul4A-DDB1-DCAF1 pour induire la dégradation protéasomale de protéines cellulaires (Le Rouzic et al., 2008). Vpr utilise ce complexe pour son action sur le cycle cellulaire. Mais cette protéine induit aussi la dégradation de complexes qui modulent la structure de la chromatine et induisent un environnement répressif comme les HDACs, ZIP ou encore NuRD (Maudet et al., 2013; Romani et al., 2016). Ainsi, nous avons démontré que le VIH-1 a développé une stratégie pour empêcher la répression de l'expression des gènes viraux par CTIP2 via Vpr. Vpr favorise la dégradation de CTIP2 par le protéasome en interagissant avec le complexe Cul4A-DDB1-DCAF1. La surexpression de Vpr corrèle avec une réduction de la liaison de CTIP2 au promoteur du VIH-1 et avec une réactivation des virus latents dans un modèle de latence de cellules microgliales. En conclusion, Vpr limite l'établissement de la latence dans les cellules infectées par le VIH-1 en induisant la dégradation protéasomale de CTIP2 (Forouzanfar et al., 2019). Depuis, d'autres études ont également démontré le rôle de Vpr dans la dégradation de protéines cellulaires associées à une répression de l'expression des gènes du VIH-1. Une étude a mis en évidence l'effet répresseur sur l'expression du VIH-1 du facteur de transcription cellulaire ZBTB2. Il est recruté sur le promoteur du VIH-1 par le facteur cellulaire ZASC1 puis ZBTB2 recrute des HDACs qui répriment la transcription des gènes. Cependant, la surexpression de Vpr et l'activation de la voie ATR répriment le recrutement de ZBTB2 et empêchent son activité répressive (Bruce et al., 2021). Une autre étude a récemment démontré le rôle de Vpr dans l'inhibition de LAPTM5, un

facteur cellulaire qui limite l'infectiosité des particules virales dans les macrophages. Vpr induit la dégradation de ce facteur par interaction avec DCAF1 et induction de la voie de dégradation protéasomale (Zhao et al., 2021). À ce jour, nous avons démontré que Vpr ne cible que CTIP2 lorsqu'il est associé au complexe remodeleur de la chromatine et non au complexe associé à PTEF-b.

CTIP2 participe donc via deux complexes spécifiques à l'établissement et au maintien de la latence du VIH-1. Ainsi, le laboratoire continue d'explorer les partenaires de CTIP2 qui pourraient jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes viraux et donc dans la latence virale. Dans cette démarche, nous avons identifié que l'hétérodimère Ku interagit avec CTIP2 (Shadrina et al., 2020). Ku est composé des sous-unités Ku70 et Ku80 et participe à la réparation des cassures double brin de l'ADN via le mécanisme NHEJ. Dans cette étude récente, une structure consensus ARN a été proposée pour la liaison de Ku aux ARN. De ce fait, il a été identifié que Ku se lie aux ARN TAR et 7SK qui sont impliqués dans la régulation de la transcription du VIH-1. Ku interagit aussi avec des protéines qui composent le complexe 7SK snRNP dont Cdk9 et HEXIM1. La liaison de Ku avec les ARN TAR et 7SK suppose que Ku pourrait également jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes du VIH-1. De plus, nous avons également démontré l'interaction entre Ku et CTIP2. Ainsi, Ku s'associe avec la forme inactive du complexe PTEF-b composé de CTIP2, HEXIM1, HMGA1 et de l'ARN 7SK. Cette étude suggère que Ku pourrait jouer un rôle dans la régulation de la transcription des gènes du VIH-1 via son interaction avec le complexe 7SK snRNP et la structure TAR.

Grâce à un projet sur l'étude des interactants de CTIP2 par immunoprécipitation suivie d'une analyse par spectrométrie de masse, nous avons récemment identifié de nouveaux complexes protéiques et ARN associés à CTIP2. Parmi ceux-ci, un complexe faisant intervenir différents membres de la voie de SUMOylation a été identifié. La SUMOylation est une modification post-traductionnelle réversible. Elle régule de nombreux processus principalement nucléaires dont la réplication, la réparation de l'ADN ou encore la transcription. La SUMOylation conduit à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice d'une protéine cible grâce à un mécanisme faisant intervenir plusieurs enzymes. L'ajout d'un isoforme SUMO sur une protéine peut modifier sa localisation, son activité ou encore sa stabilité

(pour revue (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007)). Dans de nombreux cas, la SUMOylation a été décrite comme une marque répressive (pour revue (Rosonina et al., 2017)). Ainsi, la SUMOylation exerce son activité répressive en recrutant des complexes répresseurs au niveau des promoteurs, en modulant l'association de certains facteurs de transcription aux promoteurs ou encore en entrant en compétition avec d'autres PTM qui peuvent être activatrices. Dans ce complexe associant CTIP2 et la SUMOylation (Article n°4 **Figure 1**), on retrouve l'isoforme SUMO1, les SUMO protéases SENP1 et SENP3 ainsi que les enzymes E3 ligases KAP1, NSMCE2, RanBP2.

Notre laboratoire s'est alors penché sur le rôle que pourrait jouer KAP1 dans l'expression du VIH-1 dans les cellules microgliales (Ait-Ammar et al., 2021). Nous avons démontré que KAP1 a un effet répresseur sur l'expression des gènes viraux. KAP1 coopère avec CTIP2 pour réprimer la transcription du VIH-1. De plus, KAP1 permet la dégradation de Tat par la voie du protéasome. Cette dégradation semble être induite par une forme répressive SUMOylée de KAP1. Cette étude nous a permis d'identifier un nouveau facteur associé à CTIP2 impliqué dans la latence virale. Mon projet de thèse est la suite de cette étude qui suppose une connexion entre la voie SUMO, la transcription des gènes du VIH-1 et la latence virale.

Afin de valider le lien entre CTIP2 et la SUMOylation, nous avons réalisé des expériences de microscopie confocale (Article n°4 **Figure 2**). Celles-ci nous indiquent que UBC9, la principale enzyme de la voie SUMO, relocalise avec CTIP2 quand ces deux protéines sont co-transfectées. De plus, nous avons validé le lien entre CTIP2 et les marques SUMO1 et SUMO3. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque la SUMOylation de CTIP2 a été démontrée et validée par plusieurs études (Dubuissez et al., 2016; Tirard et al., 2012; Zhang et al., 2012a). Des études ont démontré que la SUMOylation module l'activité répressive de CTIP2 dans les LTCD4+. CTIP2 réprime notamment la transcription de IL2 via le complexe NuRD. CTIP2 contient un motif PDSM qui favorise sa SUMOylation lorsqu'il est phosphorylé. La phosphorylation de CTIP2 empêche son interaction avec NuRD et MTA1 puis la SUMOylation de CTIP2 permet le recrutement de p300 qui active la transcription. Ainsi, la phosphorylation suivie de la SUMOylation induisent un changement d'activité de CTIP2 passant d'un facteur répresseur de la transcription à un facteur activateur (Dubuissez et al., 2016). Une étude sur le contrôle de la prolifération épidermique et de la différenciation au cours du développement épidermique a démontré que la SUMOylation de CTIP2 induit

sa dégradation via la voie protéasomale (Imbert and Langford, 2021; Zhang et al., 2012b). Cependant, l'effet activateur de CTIP2 phosphorylé et SUMOylé semble spécifique aux LTCD4+. Dans les cellules microgliales la SUMOylation n'affecte pas les niveaux de CTIP2. La surexpression d'UBC9 n'induit aucune variation dans les niveaux d'expression de CTIP2.

Généralement, la SUMOylation est associée à une répression de l'expression des gènes. Afin d'analyser l'effet de la SUMOylation sur l'expression des gènes du VIH-1 nous avons réalisé des essais luciférase en surexprimant, en réprimant ou en inhibant la SUMOylation. Les essais luciférase avec le vecteur rapporteur LTR-luc nous ont permis d'étudier les effets de la SUMOylation sur les deux phases, initiation et élongation de la transcription des gènes. Les essais avec le vecteur PNL4.3ΔENV-Luc permettent de mimer l'infection des cellules par le VIH-1 et donc d'étudier l'effet de la SUMOylation sur l'expression virale. La surexpression de UBC9 induit la répression de l'activité du promoteur du VIH-1 pour les deux phases de la transcription (Article n°4 **Figure 3A**). Le même effet de la surexpression de UBC9 sur l'expression virale est observé (Article n°4 **Figure 3C**). Lorsque UBC9 est réprimé et que les niveaux de SUMOylation dans les cellules sont abaissés, nous observons l'effet inverse. La transcription (Article n°4 **Figure 3B**) ainsi que l'expression (Article n°4 **Figure 3D**) du VIH-1 sont stimulées. Lorsque nous analysons en détail les résultats de ces expériences sur les deux phases de la transcription, nous constatons que la SUMOylation a un effet sur la phase d'initiation de la transcription des gènes viraux. Elle s'effectue grâce au recrutement sur le promoteur viral LTR de différents facteurs de transcription. Parmi ces facteurs de transcription on retrouve NF-κB dont l'activité est régulée par son inhibiteur IκBα. L'activité de IκBα est régulée par l'ubiquitination et la SUMOylation. Lorsque IκBα est SUMOylé, il n'est plus dégradé et séquestre NF-κB dans le cytoplasme empêchant ainsi la transcription des gènes dépendant de NF-κB. L'effet observé de la surexpression de UBC9 sur la phase d'initiation de la transcription pourrait donc s'expliquer par l'absence de NF-κB au niveau du promoteur. De même, le facteur de transcription STAT5 peut lui aussi être SUMOylé. Pour permettre la transcription, STAT5 est phosphorylé dans le cytoplasme afin d'être transporté dans le noyau pour jouer son rôle d'activateur de la transcription. Cependant, la SUMOylation de STAT5 induit son export vers le cytoplasme et empêche la transcription du VIH-1. Nos résultats sont cohérents au vu de l'effet de la SUMOylation sur ces facteurs de transcription nécessaires à l'expression des gènes du VIH-1.

Cependant, nous avons également observé un effet de la surexpression de UBC9 sur la phase d'élongation de la transcription. Cette deuxième phase nécessite la présence de la protéine virale Tat. Quelques copies de Tat sont nécessaires à l'initiation de la boucle de rétroaction positive qui permet de stimuler la transcription du VIH-1. Tat se lie à la structure TAR présente en 5' des ARN synthétisés lors de l'étape d'initiation de la transcription. La liaison Tat-TAR induit le recrutement du complexe PTEF-b. La kinase Cdk9 de PTEF-b permettra ensuite la phosphorylation de l'ARN Pol II ainsi que celle des facteurs DSIF and NELF. Ces différentes phosphorylations induisent la levée de l'état de pause subi par l'ARN Pol II et permettent de poursuivre la transcription des transcrits viraux. Ainsi en l'absence de Tat, l'étape d'élongation ne peut se faire. Cette protéine virale est primordiale à l'expression des gènes du VIH-1. Tout mécanisme qui inhibe l'activité de Tat induit donc une répression des gènes. Les résultats obtenus nous permettent de supposer que la SUMOylation pourrait avoir un effet répresseur sur Tat. Il a été démontré que dans certains cas, la SUMOylation d'une protéine empêche sa phosphorylation. Or la levée de la pause de l'ARN Pol II nécessite plusieurs phosphorylations qui pourraient être inhibées par la SUMOylation. Par exemple, STAT1 est phosphorylé sur Y701. Celle-ci active la transcription des gènes régulés par ce facteur de transcription. Mais la SUMOylation de K703 empêche cette phosphorylation activatrice (Droescher et al., 2017). De plus, il a récemment été démontré que Cdk9 était SUMOylée et que cette modification inhibe la transcription virale (Ma et al., 2019). Ces résultats nous permettent de conclure que la SUMOylation via UBC9 joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes du VIH-1. De plus, il est possible que la SUMOylation ait un rôle dans la latence virale. Nous avons ensuite testé l'influence d'un inhibiteur de la voie SUMO sur l'activité du promoteur du VIH-1. Pour cela, nous avons traité les cellules microgliales transfectées pour les essais luciférase avec 10 μ M ou 20 μ M d'acide tannique. Les résultats obtenus pour ces expériences confirment nos résultats précédents puisque l'inhibition de la SUMOylation par l'acide tannique stimule de façon significative la transcription mais aussi l'expression virale (Article n°4 **Figure 4A,B et C**).

La SUMOylation ayant un effet répresseur sur l'activité du promoteur viral, nous avons voulu observer si des marques SUMO étaient recrutées sur le promoteur du VIH-1 à l'état latent. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de ChIP-qPCR sur un modèle de cellules microgliales infectées par le VIH-1 de façon latente. Afin de comparer le recrutement des marques SUMO sur le promoteur à l'état latent et

réactivé, nous avons traité nos cellules avec la romidepsine, un HDACi. Nous avons suivi par cytométrie en flux, le pourcentage de cellules GFP positives qui correspond au pourcentage de cellules réactivées exprimant le VIH-1. La réactivation des cellules microgliales est efficace puisque qu'un traitement avec 17,5nM de romidepsine réactive plus de 70% des cellules (Article n°4 **Figure 5B**). A l'état latent, nous retrouvons la présence de CTIP2 mais aussi des marques SUMO1 et SUMO2/3 sur le promoteur viral (Article n°4 **Figure 5A**). Lorsque les cellules sont réactivées, les marques de SUMOylation et CTIP2 ne sont plus recrutées sur le promoteur. Ces résultats suggèrent que les marques SUMO sont associées à l'état de latence virale. De même, le profil de recrutement des marques SUMO est identique à celui de CTIP2, ce qui pourrait suggérer que les marques SUMO participent à la répression de l'expression des gènes du VIH-1 via CTIP2 et les complexes répresseurs auxquels il est associé. Plusieurs études ont démontré la SUMOylation des histones. La SUMOylation de H4 pourrait servir de plateforme de recrutement au complexe LSD1/CoREST/HDAC1 par la présence d'un motif SIM dans CoREST (Dhall et al., 2017). Ce recrutement induit la répression des gènes grâce à la suppression des marques épigénétiques activatrices présentes sur le promoteur. Nous avons précédemment démontré que LSD1 recrute également CTIP2 pour réprimer l'expression des gènes du VIH-1 (Le Douce et al., 2012). Ces expériences semblent donc confirmer que la SUMOylation est associée à une répression des gènes du VIH-1 et semble ainsi également participer à la latence via CTIP2.

Les essais luciférase réalisés ont démontré l'effet de la SUMOylation sur la phase d'élongation de la transcription, ce qui suggère un effet sur Tat. Ainsi, nous avons analysé la stabilité de la protéine virale Tat en présence ou en absence de UBC9. La surexpression d'UBC9 réduit la stabilité de Tat (Article n°4 **Figure 6A**) sans affecter ses niveaux d'ARNm (Article n°4 **Figure 6B**). De même, lorsque l'expression de UBC9 est réduite, la protéine Tat est stabilisée (Article n°4 **Figure 6C, D**) et ses niveaux d'ARNm restent inchangés (Article n°4 **Figure 6E**). Enfin, on observe de façon intéressante que le traitement avec 10µM d'acide tannique stabilise également Tat (Article n°4 **Figure 6F, G**). Ces résultats confirment que la SUMOylation module l'expression de Tat. Dans certains cas, il est décrit que la SUMOylation sert de signal pour induire la dégradation par le protéasome de la protéine SUMOylée. Pour étudier cette question, nous avons tout d'abord confirmé que Tat interagit avec UBC9 (Article n°4 **Figure 7A**). Nous pouvons noter que KAP1 est également associé à Tat et UBC9.

KAP1 avec son activité E3 ligase facilite la SUMOylation des protéines. On peut donc suggérer que dans le cas de Tat, KAP1 faciliterait sa SUMOylation. Nous avons effectivement montré, pour la première fois, la SUMOylation de Tat (Article n°4 **Figure 7B3**). Dans cette figure, on observe que la surexpression de KAP1 semble diminuer la détection des formes SUMOylées de Tat (Article n°4 **Figure 7B3, lignes 4 vs 5 et histogramme**). Cette observation est un indice de plus dans l'hypothèse de la dégradation de Tat par la SUMOylation puisque KAP1 facilite la SUMOylation. Afin de savoir si Tat pouvait être dégradé par la voie du protéasome, nous avons surexprimé Tat et UBC9 et traité les cellules avec un inhibiteur du protéasome. Lors de nos premières expériences, nous avons observé que la surexpression de UBC9 déstabilisait Tat (Article n°4 **Figure 6A**). Ici nous observons que le traitement au MG132 restaure l'expression de Tat (Article n°4 **Figure 7C**). Nous pouvons ainsi supposer que Tat est dégradé par la voie du protéasome et que la SUMOylation via UBC9 facilite cette dégradation. La SUMOylation et plus précisément la formation de chaînes SUMO peut induire l'ubiquitination des protéines SUMOylées puis leur dégradation par le protéasome. Le lien entre les chaînes SUMO et l'ubiquitination s'effectue chez les Humains via RNF4. Cette protéine possède un domaine SIM qui lui permet de reconnaître les protéines SUMOylées et un domaine RING qui permet l'ubiquitination des protéines SUMOylées. Nous pouvons ainsi supposer que la dégradation de Tat via la SUMOylation pourrait s'expliquer par l'intervention de RNF4 (Article n°4 **Figure 9**). Une étude récente a démontré que USP7 stabilise Tat par deubiquitination et que le traitement avec un inhibiteur de deubiquitinase induit la dégradation de Tat (Ali et al., 2017). Elle démontre que l'ubiquitination de Tat pourrait induire sa dégradation. Notre hypothèse qui suggère que la SUMOylation peut être un signal à l'ubiquitination de Tat puis et à sa dégradation est en accord avec cette étude. En conclusion, nous avons démontré que la SUMOylation de Tat induit sa dégradation par le protéasome. La dégradation de Tat pourrait donc expliquer l'effet de la SUMOylation sur la transcription du VIH-1. Nous avons également démontré que KAP1 interagit et colocalise avec Tat et que KAP1 participe à la dégradation protéasomale de Tat. De plus, CTIP2 coopère avec KAP1 pour réprimer l'expression des gènes du VIH-1 et participe à l'état de latence (Ait-Ammar et al., 2021). Ces résultats suggèrent donc que la SUMOylation intervient dans les mécanismes de répression de l'expression des gènes du VIH-1 liés à la latence via CTIP2 et via la dégradation de Tat.

Dans le but de réduire les réservoirs viraux qui sont la cause de la persistance du VIH-1 dans l'organisme de patients infectés, plusieurs stratégies de guérison ont été proposées. L'une d'elle est la stratégie *Shock and Kill* qui réactive l'expression des virus grâce à des LRAs. La recherche de LRAs se base sur les mécanismes qui interviennent dans la latence du VIH-1. Dans notre étude, nous démontrons que la SUMOylation joue un rôle important dans la répression de la transcription. Nous avons donc testé la capacité des inhibiteurs de la SUMOylation (SUMOi) à réactiver l'expression des gènes viraux grâce à un modèle de cellules microgliales infectées latentes. Par ces expériences de cytométrie en flux, nous avons déterminé que le seul SUMOi capable de réactiver l'expression des gènes viraux en traitement unique est le ML792 (Article n°4 **Figure 8A, panel 3**). L'acide tannique et le 2D08 en traitement unique n'induisent pas de réactivation significative (Article n°4 **Figure 8A, panel 1 et 2**). Nous avons ensuite traité les cellules avec deux LRAs de façon simultanée (Figure 33). Les cellules ont été traitées avec la romidepsine, un HDACi et avec un SUMOi. Nous observons à nouveau que le seul SUMOi efficace en combinaison avec la romidepsine est la molécule ML792 (Article n°4 **Figure 8C, panel 3**). De plus, on observe un effet de synergie entre la romidepsine et ML792 (Article n°4 **Figure 8D**). Enfin, nous avons traité les cellules de façon séquentielle (Figure 33) dans un premier temps avec un SUMOi puis dans un second temps avec un HDACi (romidepsine ou SAHA). Le traitement séquentiel avec l'acide tannique et la romidepsine réactive de façon efficace les cellules latentes et montre un effet synergique conséquent (Article n°4 **Figure 8E, panel 1**). En revanche, aucune synergie n'est observée avec la combinaison AT+SAHA. Par contre, le traitement séquentiel avec le ML792 puis les deux HDACi, romidepsine et SAHA réactive de façon synergique les cellules microgliales latentes (Article n°4 **Figure 8E, panel 2**). Aucune réactivation ni synergie n'est observée pour le SUMOi, 2D08. Ces résultats démontrent que certains SUMOi pourraient être utilisés dans le cadre de la stratégie *Shock and Kill*. Les expériences de co-traitements et de traitements séquentiels indiquent également que les marques de SUMOylation pourraient être recrutées sur le promoteur viral dans un second temps. Il serait donc d'abord nécessaire d'induire la déSUMOylation, puis d'inhiber l'action des HDACs pour réactiver efficacement les réservoirs. L'activité répressive de la SUMOylation que nous avons observée dans notre étude pourrait suggérer l'utilisation de la SUMOylation dans la stratégie *Block and Lock*. Au lieu d'inhiber la SUMOylation, il pourrait être envisagé de la renforcer par exemple en inhibant l'action

des SENP qui retirent les marques SUMO des protéines SUMOylées. Ceci permettrait de maintenir l'effet répresseur induit par la SUMOylation sur la transcription et donc de bloquer les réservoirs.

En conclusion, nous avons clairement démontré que la SUMOylation participe à la répression de l'expression des gènes du VIH-1. Cependant, il est nécessaire d'étudier plus précisément les mécanismes moléculaires qui permettent cette répression via SUMO. Quel est le lien entre CTIP2, KAP1 et la SUMOylation ? A quel complexe KAP1 et SUMO appartiennent-ils ? L'effet de la SUMOylation sur la phase d'élongation s'explique-t-il uniquement par la dégradation de Tat ou la SUMOylation intervient-elle dans le complexe PTEF-b inactif ? Pour répondre à ces questions, il sera nécessaire de réaliser des expériences d'immunoprécipitation en présence de CTIP2 et des autres membres des complexes. Nos résultats et l'hypothèse qui en découle suggèrent l'implication de RNF4 dans la dégradation de Tat (Article n°4 Fig. 9). Nos prochaines expériences consisteront à réduire l'expression de RNF4 par siRNA en présence de UBC9 et à observer si Tat est toujours dégradé. Si notre hypothèse est correcte, l'absence de RNF4 devrait empêcher ou réduire la dégradation de Tat. Ces expériences permettraient de démontrer clairement que la SUMOylation est un signal qui induit la dégradation de Tat via l'ubiquitination et RNF4. De même, il serait intéressant de mieux comprendre les mécanismes de réactivation observés en présence des SUMOi et des HDACi. Dans ce but, nous pourrions réaliser des immunoprécipitations de la chromatine aux différents temps de traitement et comparer le recrutement des différents facteurs qui interviennent dans la latence virale. De plus, il sera nécessaire de tester l'efficacité des SUMOi sur des cellules primaires, les LTCD4⁺ ou macrophages, puisque les cellules microgliales primaires sont difficiles d'accès. Enfin, nous avons démontré l'effet répresseur de la SUMOylation dans les cellules microgliales. Or, plusieurs études ont déjà démontré que les mécanismes de répression et de latence pouvaient différer en fonction du type cellulaire. Il serait donc intéressant d'étudier si la SUMOylation a le même effet dans les lymphocytes CD4⁺ et notamment dans les cellules primaires.

Matériel et Méthodes

1. Matériels

1.1. Lignées cellulaires

La lignée cellulaire microgiale humaine classique (ATCC® CRL- 3304TM) nous a été fournie par le Pr M. Tardieu (Janabi et al., 1995). La lignée cellulaire CHME5-HIV nous a été fournie par le Pr J Karn (Wires et al., 2012), il s'agit d'un modèle de latence du VIH-1. Les cellules microgiales, les CHME5-HIV et les cellules HEK 293T (ATCC® CRL-3216TM) ont été cultivées dans du milieu Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal inactivé à la chaleur et par 100U/mL de pénicilline/streptomycine. Les cellules sont maintenues en culture dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂ et dans une atmosphère saturée en humidité.

1.2. Vecteurs plasmidiques

Les plasmides CDNA3, flag-Tat, flag-CTIP2, RFP-CTIP2, DsRed-Tat, LTR-Luc, PNL4.3ΔENVLuc utilisés dans ces travaux ont déjà été décrits précédemment (Rohr et al., 2003) (Marban et al., 2005). Les plasmides UBC9, shUBC9, HA-Sumo1, HA-Sumo2 et HA-Sumo3 nous ont été donnés par le Dr Virginie Gautier du laboratoire CEPHR, UCD, Irlande. Le plasmide CMV-Renilla provient de la compagnie Promega. Le plasmide GFP-UBC9 nous a été fourni par le Dr Frédérique Tesson de l'Université de Ottawa, Canada.

1.3. Amorces et sondes utilisées en qPCR

Amorce		Séquence
GAPDH	Sens	5'- GGA CCT GAC CTG CCG TCT AGA A-3'
	Anti-sens	5'- GGG TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3'
Tat	Sens	5'-ACT CGA CAG AGG AGA GCA AG-3'
	Anti-sens	5'-GAG ATC TGA CTG TTC TGA TGA-3'
LTR 5'	Sens	5'-TGG AAA ATC TCT AGC AGT GGC-3'
	Anti-sens	5'-GAG TCC TGC GTC GAG AGA TCT-3

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées en qPCR

2. Méthodes

2.1. Acides nucléiques

2.1.1. Quantification des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre à micro-volume appelé nanodrop (ThermoFisher), par détermination de l'absorbance à 260 nm. Les rapports A_{260}/A_{280} ainsi que A_{260}/A_{230} sont calculés afin de déterminer la pureté et la qualité des solutions d'ADN ou d'ARN. Le rapport A_{260}/A_{280} atteste d'une contamination par les protéines et le rapport A_{260}/A_{230} atteste d'une contamination par différents composés chimiques (phénol, EDTA, urée, isothiocyanate de guanidine...).

2.1.2. Électrophorèse des acides nucléiques

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les acides nucléiques en fonction de leur taille grâce aux mailles formées par l'agarose. Ils migreront dans le gel par un courant électrique. Le gel est composé d'agarose 1% dilué dans du tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) (Euromedex) contenant également du BET à une concentration de 1 µg/mL (Biorad). Les échantillons d'acides nucléiques sont dilués dans du tampon de charge 6X et déposés dans le gel en plus d'un marqueur de poids moléculaire. La migration est réalisée dans du tampon TBE à 100 volts pendant 30 minutes. Enfin, les acides nucléiques sont révélés par les UV grâce au BET qui se sera intercalé entre les bases des acides nucléiques.

2.2. Méthodes d'étude de l'ARN

2.2.1. Extraction des ARN totaux

La manipulation des ARN nécessite une attention particulière car ils sont très sensibles et risquent d'être dégradés par les RNAses. Les expériences sont réalisées dans la glace avec un matériel autoclavé. Les solutions sont également propres, filtrées ou autoclavées. Deux techniques ont été utilisées pour l'extraction des ARN, le protocole avec le réactif TRIzol ou l'utilisation d'un kit commercial NucleoSpin® RNA Macherey-

Nagel. Une fois les ARN extraits, la concentration en ARN des échantillons est déterminée à l'aide du nanodrop.

2.2.1.1. Extraction par le Kit NucleoSpin® RNA

L'extraction des ARN est réalisée l'aide du kit NucleoSpin® RNA Macherey-Nagel, selon les recommandations du fabricant.

2.2.1.2. Extraction par le réactif TRIzol

Les ARN sont extraits de cellules HEK 293T transfectées. Pour ce faire, les cellules sont collectées dans des tubes 1,5mL et lavées 2 fois avec du PBS 1X stérile (centrifugation 1500 rpm, 5 minutes, 4°C) afin de retirer toute trace de milieu de culture. Un millilitre de TRIzol est ajouté aux culots des cellules. Les échantillons sont ensuite vortexés afin d'obtenir un mélange homogène. Puis, 200µL de chloroforme sont ajoutés aux échantillons et vortexés pendant 15 secondes. Les mélanges sont incubés 2 minutes à température ambiante puis centrifugés 15 minutes à 12 000 rpm. La phase aqueuse est ensuite récupérée et son volume est déterminé afin de pouvoir ajouter à l'échantillon 1 volume d'isopropanol en plus d'1 µL de glycoblue. Les échantillons sont incubés 10 minutes à température ambiante et à nouveau centrifugés 10 minutes à 12 000 rpm. Les culots obtenus contenant les ARN sont lavés 2 fois à l'aide d'éthanol 70% froid. Les centrifugations des lavages sont effectuées à 7 000 rpm pendant 5 minutes. Enfin, les culots sont séchés à température ambiante et resuspendus dans 60 µL d'eau DEPC.

2.2.2. Traitement DNases

Pour éliminer l'ADN pouvant persister après l'extraction des ARN, un traitement avec l'enzyme DNase peut être réalisé. Pour ce faire, 6 µL de tampon TURBO™ DNase (Life Technologies) sont ajoutés aux 60 µL de l'échantillon d'ARN. Un microlitre de l'enzyme TURBO™ DNase (2U) est ensuite ajouté aux mélanges qui sont incubés à 37°C pendant 30 minutes. Une fois le temps d'incubation écoulé, l'ARN est à nouveau extrait par la méthode phénol/chloroforme pH4.

2.2.3. Rétro-transcription des ARN en ADNc

La première étape de l'analyse des ARN par RT-qPCR est la rétro-transcription (RT) des ARN en ADN complémentaires (ADNc). Pour ce faire, 4 µL d'iScript™ RT Supermix (BioRad) sont ajoutés à 500ng d'ARN pour un volume final complété avec 20µL d'eau DEPC. La RT est réalisée selon les paramètres suivants : 5 minutes à 25°C; 20 minutes à 46°C et 1 minute à 95°C dans un thermocycleur (Eppendorf).

2.3. Méthodes d'étude de l'ADN

2.3.1. Production et préparation des vecteurs plasmidiques

La première étape dans la production des plasmides est la transformation bactérienne. Pour ce faire, 50 µL de bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5α (ThermoFisher) sont incubées avec 100ng du plasmide à amplifier pendant 3 minutes dans la glace. Puis les tubes sont placés au bain-marie à 42°C pendant 45 secondes afin de faire subir aux bactéries un choc thermique et d'y introduire l'ADN. Le tube est ensuite remis à incuber dans la glace pour 2 minutes afin de rigidifier la membrane bactérienne. Puis, 500µL de milieu LB sont ajoutés aux bactéries, elles seront ensuite incubées à 37°C pendant 45 minutes avant d'être étalées sur une boîte de pétri contenant du milieu LB supplémenté avec l'antibiotique correspondant au gène de résistance à un antibiotique porté par le plasmide. Ces boîtes sont incubées à 37°C toute la nuit afin que les bactéries puissent croître. Le lendemain, les bactéries transformées sont mises en préculture pendant 8 heures dans du milieu LB liquide avec antibiotique. La préculture est ensuite inoculée dans 250mL de milieu LB liquide supplémenté en antibiotique avant d'être incubée toute la nuit, à 37°C et sous agitation. Le lendemain, les plasmides sont extraits avec le kit NucleoBond® Xtra Maxipep™ Macherey-Nagel selon les recommandations du fournisseur. Enfin, la concentration en ADN est déterminée à l'aide du nanodrop et les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose.

2.3.2. Extraction de l'ADN total

2.3.2.1. Extraction par la méthode phénol/chloroforme/IAA pH8

Cette méthode d'extraction de l'ADN a principalement été utilisée pour extraire l'ADN suite aux expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Concrètement, un volume de Phenol/Chloroform/IAA pH8 est ajouté à l'échantillon qui est ensuite vortexé fortement pendant 30 secondes et centrifugé pendant 15min à 14 000 rpm. La phase aqueuse est ensuite prélevée et déposée dans un nouveau tube 1,5mL. Un microlitre de glycoblue ainsi que 3 volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés dans le tube. L'échantillon est ensuite incubé pendant au moins 1 heure à -20°C. Une fois le temps d'incubation écoulé, l'échantillon est centrifugé pendant 15 minutes à 14 000 rpm. Le surnageant est retiré, le culot lavé avec de l'éthanol 70% (vol/vol) froid et centrifugé pendant 2 minutes à 14 000 rpm. Le culot est séché et resuspendu dans 60µL d'eau DEPC.

2.3.2.2. Extraction par le kit de purification des produits de PCR (GE)

Cette méthode d'extraction de l'ADN a été utilisée principalement pour extraire l'ADN suite aux expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. L'ADN est extrait selon les recommandations du fournisseur (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification GE Healthcare).

2.3.3. qPCR

La réaction de polymérisation en chaine permet d'amplifier de façon spécifique une séquence d'ADN donnée à l'aide d'amorces spécifiques à la séquence. Pour ce faire différents mélanges réactionnels contenant notamment l'ADN polymérase nécessaire à la réaction de PCR, les dNTPs, le SYBR Green et les amorces spécifiques sont réalisés pour chaque séquence d'ADN ciblée. Le tableau 2 montre un exemple de mélange pour une condition de PCR. Chaque échantillon d'ADN est analysé en triplicat. Un contrôle négatif est ajouté dans lequel l'ADN est remplacé par de l'eau stérile. Les mélanges et échantillons sont déposés dans une plaque 96 puits. La PCR quantitative est réalisée selon les paramètres suivants : une phase de préchauffage de 2 minutes à 95°C ; un cycle de 5 secondes à 95°C et 30 secondes à 60°C répété 39 fois puis ; une phase finale de 5 secondes à 95°C. Ce programme est réalisé dans le thermocycleur (CFX-Connect, BioRad).

Composé	Volume (μL) pour 1 réaction
SYBR Green (SsoAdvanced™ Universal SYBR® BioRad)	10
Amorce Sens (F) (concentration 10μM)	0,75
Amorce Anti-Sens (R) (concentration 10μM)	0,75
Eau sterile	6,5
ADN ou ADNc	2

Tableau 3 : Exemple de composition du mélange réactionnel pour la qPCR

2.3.4. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les cellules CHME5-HIV sontensemencées dans des boites de culture 150mm à une concentration de 4.10^6 cellules/mL. Les ChIP ont été réalisés sur des cellules latentes et réactivées, pour la condition réactivée un traitement à 17,5nM de romidepsine (Sigma) a été réalisé 24 heures avant de procéder au début du protocole de ChIP sur les cellulesensemencées la veille. Pour la condition non réactivée, les cellules sont traitées avec du DMSO (selon la même dilution que la romidepsine. Le jour du début du protocole de ChIP, les cellules sont trypsinisées pendant 5 minutes et 200μL de cellules sont récupérées afin d'analyser le pourcentage de cellules positives à la GFP (cellules réactivées) par cytométrie. Les cellules restantes sont fixées avec 1% PFA pendant 10 minutes sous agitation à température ambiante et la fixation est arrêtée par incubation des cellules 5 minutes avec une solution de Tris-Glycine (10mM TrisHCl pH8, 1,2M Glycine) toujours sous agitation à température ambiante. Les cellules sont ensuite centrifugées 5 minutes à 1 500 rpm, 4°C puis lavées 3 fois avec du PBS 1X froid. Le culot de cellules est ensuite resuspendu dans 300μL de tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA, 1% SDS) supplémentés d'inhibiteurs de protéases. Puis, les cellules sont soumises à 5 cycles de sonication (5 fois 10 min 30secON/30secOFF). Après 10 minutes de centrifugation à 11 000 rpm, 4°C, la chromatine est resuspendue dans le tampon de dilution (16mM Tris HCl pH8,1, 1mM EDTA, 0,01% SDS, 10X Triton, 167mM NaCl) supplémenté d'inhibiteurs de protéases. La concentration en ADN est mesurée à l'aide du nanodrop. Vingt microlitres de chromatine sont conservés pour s'assurer de la qualité de la chromatine et ajoutés à 180μL de tampon d'élution (1% SDS, 10% NaHCO₃) et 8μL de NaCl 5M. Cet échantillon de chromatine est incubé toute la nuit à 65°C. Le lendemain l'échantillon est déposé sur gel d'agarose 1% afin de contrôler la taille (~500pb) de la chromatine

obtenue après sonication. L'immunoprécipitation de la chromatine est ensuite réalisée avec 100µg de chromatine par condition (par protéine/anticorps étudié), la chromatine doit être diluée 5 fois avec le tampon de dilution afin que la concentration finale en SDS soit de 0,1%. Avant de procéder au mélange anticorps/chromatine, une étape de « preclearing » est réalisée avec 10µL de billes magnétiques (lavées dans du tampon de dilution ChIP + 0,1% de BSA) mises en contact avec le volume nécessaire de chromatine par condition, pendant 1 heure à 4°C et sous rotation. La chromatine est ensuite récupérée et incubée avec l'anticorps (5µg par IP) adéquat toute la nuit à 4°C sous rotation. Une condition appelée « input » est ajoutée aux échantillons. Cette condition est composée de 100x moins de chromatine que les conditions échantillon. Si pour une condition échantillon, 100µL de chromatine sont soumis à IP alors l'Input sera constitué d'1µL de chromatine. L'input correspond à la quantité totale d'ADN qui a subi tout le protocole de ChIP sans sélection par les anticorps. Il est conservé à 4°C toute la nuit (sans billes ni anticorps). Le lendemain, les billes magnétiques (Invitrogen) sont lavées dans du tampon de dilution ChIP supplémenté avec 0,1% de BSA afin de réduire les liaisons aspécifiques. Vingt microlitres de billes magnétiques sont ajoutées à chaque condition échantillon et incubées pendant 2 heures à 4°C et sous rotation. Une fois le temps d'incubation écoulé, les billes sont lavées à l'aide de différents tampons. Deux lavages de 5 minutes de chaque tampon supplémenté d'inhibiteurs de protéases sont réalisés, sous rotation et à 4°C : tampon à faible concentration saline (20mM Tris HCl pH8, 2mM EDTA, 0,1% SDS, 10X Triton, 150mM NaCl), tampon à forte concentration saline (20mM Tris HCl pH8, 2mM EDTA, 0,1% SDS, 10X Triton, 500mM NaCl) et tampon LiCl (10mM Tris HCl pH8, 1mM EDTA, 1% NP40, 25mM acide désoxycholique, 250mM LiCl). Enfin, 2 lavages avec le tampon TE (10mM Tris HCl pH8 et 1mM EDTA) sont réalisés pendant 5 minutes, chacun à température ambiante. Une fois tous les lavages effectués, la chromatine est éluée à l'aide du tampon d'éluion (1% SDS, 100mM NaHCO₃) supplémenté d'inhibiteurs de protéases. Deux étapes d'éluion sont réalisées avec à chaque fois de 120µL de tampon d'éluion, les échantillons sont incubés pendant 15 minutes à température ambiante et sous rotation. Du tampon d'éluion est également ajouté à l'input afin d'avoir un volume final identique aux échantillons, soit 240µL. La chromatine est ensuite incubée à 65°C toute la nuit après y avoir ajouté 10µL de NaCl 5M, afin de supprimer sa réticulation. Le lendemain, 1µL de RNase A (10mg/ml) est ajouté à chaque échantillon et incubé pendant 30 minutes à 37°C. Ensuite 8µL de TRIS-HCl 1M pH6.5, 4µL d'EDTA 0,5M et

1µL de Protéinase K (20 mg/mL) sont ajoutés à chaque échantillon puis incubés 1 heure à 45°C. Enfin, l'ADN est extrait des échantillons à l'aide du kit de purification des produits de PCR (GE) ou du protocole Phenol/Chloroform/IAA pH8. Finalement, les échantillons d'ADN sont soumis à une qPCR à l'aide des amorces disponibles dans le tableau 2, afin de déterminer la présence des différentes protéines étudiées sur une région spécifique du génome.

2.3.5. Essais luciférase

Quarante-huit heures après la transfection, le milieu est retiré des cellules et le réactif Dual-Glo® Luciferase du kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega) est ajouté aux cellules. Ce réactif est dilué au demi avec du PBS1X pour un volume final de 80µL par puits. La plaque 48 puits est incubée 30 minutes sous agitation afin de permettre aux cellules de se détacher. Puis, les cellules sont transférées dans une plaque 96 puits blanche à fond blanc afin de lire l'activité de la luciférase firefly à l'aide du luminomètre GLOMAX. Enfin, le réactif Dual-Glo® Stop & Glo® du kit est ajouté aux cellules à raison de 75µL par puits. La plaque est incubée 20 minutes à obscurité puis l'activité de la luciférase *renilla* est mesurée. L'activité de la luciférase firefly est normalisée par l'activité de la luciférase *renilla*. Les valeurs présentées correspondent à une moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat.

2.4. Méthodes d'étude des protéines

2.4.1. Extraction des protéines

Pour certaines expériences, lorsque c'est indiqué, les cellules ont été traitées avec un inhibiteur du protéasome, le MG132 (BML-PI102-0025 Enzo). Le traitement est effectué à une concentration de 10µM pendant 4 heures avant de procéder à l'extraction des protéines. De plus pendant l'extraction, des inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics) sont ajoutés aux tampons d'extraction afin de limiter la dégradation des protéines. Deux protocoles ont été utilisés afin d'extraire soit les protéines nucléaires soit les protéines totales. Toutes les étapes d'extraction sont réalisées dans la glace ou à 4°C.

2.4.1.1. Extraction des protéines nucléaires

Quarante-huit heures après la transfection, les protéines nucléaires sont extraites des cellules. Pour ce faire, les cellules sont resuspendues dans leur milieu, transférées dans des tubes 15mL et centrifugées pendant 5 minutes à 1500 rpm et 4°C. Puis le milieu est retiré et le culot de cellules resuspendu dans du PBS 1X froid. Les cellules sont à nouveau centrifugées 5 minutes à 1500 rpm. Le lavage est effectué deux fois. Puis les cellules sont lysées à l'aide d'un premier tampon, (10mM HEPES pH7.5 ; 10mM KCl ; 0,1mM EDTA ; 1mM DTT ; 0,5% NP40 ; 0,5mM PMSF) pendant 20 minutes sous agitation, à 4°C. Les cellules sont vortexées 10 secondes et centrifugées 10 minutes à 14 000 rpm, 4°C. Le surnageant est retiré et le second tampon (20mM HEPES pH7.5 ; 400mM NaCl ; 1mM EDTA ; 1mM DTT ; 1mM PMSF) est ajouté aux culots de cellules. Les échantillons sont incubés 30 minutes, sous agitation à 4°C. Puis les cellules sont centrifugées 10 minutes à 14 000 rpm, 4°C et le surnageant contenant les protéines est récupéré. La concentration des échantillons en protéines est déterminée par un dosage de Bradford.

2.4.1.2. Extraction des protéines totales

Quarante-huit heures après la transfection, les cellules sont resuspendues et lavées selon le même protocole que pour l'extraction des protéines nucléaires. Une fois l'obtention d'un culot de cellules propres, elles sont lysées par incubation dans du tampon RIPA (50mM Tris ; 150mM NaCl ; 1% NP40 ; 0,1% SDS ; 1,5mM MgCl₂) pendant 30 minutes sous agitation à 4°C. Une fois le temps d'incubation écoulé, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 10 000 rpm, 4°C. Le surnageant est récupéré et les protéines nucléaires sont dosées par la méthode BCA.

2.5. Quantification des protéines

2.5.1. Quantification des protéines par la méthode de Bradford

Afin de déterminer la concentration des échantillons en protéines nucléaires, un dosage selon la méthode de Bradford est réalisé. Le réactif de Bradford (Protein Assay

Dye Reagent Concentrate, BioRad) contient du bleu de Coomassie qui se lie aux acides aminés basiques et aromatiques. En pratique, une gamme étalon est réalisée avec des concentrations croissantes et connues d'albumine de sérum bovin (BSA). La droite d'étalonnage définie par l'absorbance à 595nm en fonction de la quantité en protéines nous permettra de déterminer la concentration des échantillons après mesure de leur absorbance au spectrophotomètre à 595nm. Le dosage est réalisé à l'aide de 1µL de l'échantillon à doser auquel est ajouté 1mL de réactif de Bradford. Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance à 595nm est mesurée et les résultats comparés à la gamme étalon.

2.5.2. Quantification par la méthode BCA

La concentration des échantillons en protéines totales extraites avec le tampon RIPA est déterminée à l'aide du kit Pierce™ BCA Protein (Thermo Scientific™). Selon le même principe que le dosage des protéines par la méthode de Bradford, une gamme étalon est réalisée. Le protocole est effectué selon les recommandations du fournisseur. En pratique, 10µL d'échantillon à doser sont déposés dans une plaque 96 puits blanche à fond transparent ainsi que 200µL de réactif (ratio 1:8 composé des réactifs A et B). Puis la plaque est incubée 30 minutes à 37°C dans l'incubateur de culture cellulaire. Une fois le temps d'incubation écoulé, la plaque est lue à 562nm et les résultats sont comparés à la gamme étalon.

2.5.3. Électrophorèse SDS-PAGE et western blot

Le gel SDS-PAGE est composé d'un gel de concentration (5% acrylamide, 0,5mM Tris-HCl pH6.8) qui constitue la partie supérieure du gel SDS-PAGE. Celui-ci permet de concentrer les protéines afin qu'elles entrent de façon uniforme dans le gel de séparation (1,5mM Tris-HCl pH8.8) qui permet de séparer les protéines en fonction de leur taille. Selon les protéines étudiées, la concentration en acrylamide du gel de séparation diffère (de 15% à 10% pour les plus grosses protéines).

Pour la préparation des échantillons protéiques, 30µg de protéines sont mélangées à du tampon de dénaturation (900µL Laemmli 4X (Biorad) et 100µL βmercaptoethanol) et chauffées 5 minutes à 95°C. Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits du gel plus un puits contenant un marqueur de poids moléculaire. La migration est réalisée pendant 30 minutes à 90 volts puis 1 heure à 130 volts dans du tampon de

migration (25mM Tris ; 192mM Glycine ; 0,1% SDS). Une fois la migration terminée, le sandwich composé d'un papier filtre, du gel, de la membrane nitrocellulose puis d'un nouveau papier filtre est réalisé afin de transférer les protéines du gel vers la membrane. Le transfert est réalisé pendant 1h10 à 200mA dans du tampon de transfert (25mM Tris ; 192mM Glycine ; 20% Éthanol). Une fois le transfert effectué, la membrane est incubée 1 heure sous légère agitation avec le tampon de blocage (4% lait, PBS 1X) afin de saturer les sites de fixation aspécifiques. La membrane est ensuite incubée toute la nuit sous agitation à 4°C avec les anticorps primaires correspondants dilués dans le tampon de blocage. Le lendemain, la membrane est lavée 5 fois pendant 5 minutes avec du tampon de lavage (PBS 1X, 1% Tween). Puis la membrane est incubée avec les anticorps secondaires correspondant aux anticorps primaires pendant 3 heures sous agitation à température ambiante. Enfin, les protéines sont visualisées par chemiluminescence avec le réactif SuperSignal™ West Dura ou SuperSignal™ West Femto (Thermo Fisher) à l'aide du Fusion FX Spectra (Vilber).

2.5.4. Immunoprécipitation des protéines

Après extraction des protéines nucléaires et vérification de l'efficacité de transfection par western blot, l'IP (immunoprécipitation) des protéines est réalisée. Pour ce faire, les billes magnétiques (C03010021-220, Invitrogen) (20µL/IP) sont lavées trois fois avec le tampon IPLS (50mM TrisHCl pH7,5 ; 120mM NaCl ; 0,5mM EDTA ; 0,5% NP40 ; 10% glycérol) puis incubées toute la journée avec les anticorps (5µg). Pendant 1 heure 500µg d'échantillon protéique (par condition) sont incubés avec 10µL de billes magnétiques (sans anticorps) afin de retirer les interactions aspécifiques. Enfin, les échantillons protéiques sont incubés toute la nuit à 4°C avec les billes magnétiques sur lesquelles les anticorps correspondants ont été fixés. Le lendemain, des lavages de 10 minutes sous rotation et à 4°C sont réalisés : 3 lavages IPLS, 3 lavages IPHS (50mM TrisHCl pH7,5 ; 0,5M NaCl 0,5mM EDTA ; 0,5% NP40 ; 10% glycérol), 2 lavages IPLS et enfin 2 lavages PBS 1X. Les protéines immunoprécipitées sont ensuite éluées en chauffant les échantillons à 95°C pendant 15 minutes dans du tampon de dénaturation 4X. Les protéines sont ensuite analysées par western blot selon le protocole décrit précédemment.

2.6. Méthodes de transfection

Trois méthodes de transfection ont été utilisées selon les cellules et les expériences réalisées. La méthode de transfection de co-précipitation au chlorure de calcium a été utilisée pour les premières expériences de cette thèse mais a rapidement été remplacée par la méthode de transfection au PEI (polyéthylèneimine) car le protocole est plus simple, plus rapide et permet de meilleurs rendements. La transfection par le jetPRIME® (Polyplus Transfection) est réservée aux expériences de microscopie sur les cellules microgliales humaines classiques.

2.6.1. Transfection des cellules HEK293T

Les cellules HEK 293T ont été cultivées dans des boîtes de culture 100mm. Les cellules sont soit transfectées par la méthode de co-précipitation au chlorure de calcium (CaCl_2) ou du PEI. Les mélanges de transfection ont été réalisés avec les plasmides indiqués dans les différentes figures et contiennent 30 μg d'ADN final pour la méthode au CaCl_2 ou 20 μg d'ADN final pour la méthode au PEI. Les cellules sont transfectées en suspension à pour la méthode CaCl_2 ou adhérentes pour le PEI. Au moment de la transfection, les cellules ont une concentration de 3.10⁵cellules/mL.

2.6.1.1. Transfection par la méthode de co-précipitation au chlorure de calcium

En pratique, 30 μg final d'ADN plasmidique sont ajoutés dans un volume final de TE (10mM Tris pH 7,4 ; 1mM EDTA) de 656 μL . Puis, 750 μL de tampon HBSS pH7 (280mM NaCl, 10mM KCl, 1,5mM Na_2HPO_4 , 12mM Dextrose, 50mM HEPES) et enfin, 94 μL de CaCl_2 2M sont ajoutés aux mélanges et homogénéisés délicatement. Les mélanges sont incubés 30 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, les cellules sont diluées afin d'avoir soit, 3.10⁶ cellules par boîte de culture 100mm pour les WB et les IP, soit 1.10⁶ cellules par boîte de culture 33mm pour l'extraction des ARN. Lorsque le temps d'incubation est écoulé, les mélanges sont délicatement déposés sur toute la surface des boîtes. Vingt-quatre heures après transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais. Les protéines ou ARN sont extraits 48 heures après la transfection.

2.6.1.2. Transfection par la méthode PEI

Les cellules HEK293T ont été ensemencées dans boîtes 100mm 24 heures avant transfection. Le jour de la transfection, les cellules ont été transfectées à l'aide du PEI selon le protocole de la compagnie Polyplus-Transfection avec les plasmides indiqués dans les différentes figures. En pratique, 20µg final d'ADN plasmidique sont ajoutés dans un volume final de NaCl 150mM de 250µL. En parallèle, le réactif est préparé en mélangeant 40µL de PEI dans 250µL final de NaCl 150mM par condition. Le mélange est vortexé, puis, le réactif PEI dilué est ajouté aux mélanges d'ADN précédemment réalisés. Le mélange ADN-PEI est vortexé puis incubé 20 minutes à température ambiante. Une fois le temps écoulé, les mélanges sont ajoutés aux cellules dans les boîtes à raison de 500µL de mélange ADN-PEI. Le milieu des cellules est remplacé par du milieu frais, 4 heures après la transfection.

2.6.2. Transfection des cellules microgliales

2.6.2.1. Transfection par la méthode PEI

Cette méthode de transfection est utilisée pour réaliser les essais luciférase. Les cellules microgliales humaines classiques ont été ensemencées dans des plaques 48 puits, 24 heures avant transfection, à une densité cellulaire de $3 \cdot 10^4$ par puits. Puis les cellules ont été transfectées à l'aide du PEI selon le protocole de la compagnie Polyplus-Transfection avec les plasmides indiqués dans les différentes figures. En pratique, des mélanges de 2µg d'ADN par condition de transfection sont préparés dans un volume final de NaCl 150mM de 100µL. La quantité finale d'ADN par puits est de 0,5µg d'ADN, un mélange ADN-PEI permet la transfection de 3 puits afin d'avoir chaque condition en triplicat. En parallèle, le réactif est préparé en mélangeant 4µL de PEI dans 100µL final de NaCl 150mM par condition. Le mélange est vortexé puis le réactif PEI dilué est ajouté aux mélanges d'ADN précédemment réalisés. Le mélange ADN-PEI est vortexé puis incubé 20 min à température ambiante. Une fois le temps écoulé, les mélanges sont ajoutés aux cellules dans les puits à raison de 50µL d'ADN-PEI. Si possible, 4 heures après la transfection, le milieu des cellules est changé.

2.6.2.2. Transfection par la méthode jetPRIME

Cette méthode de transfection est utilisée pour réaliser les expériences de microscopie. Au préalable des lamelles de microscopie sont déposées au fond des puits de la plaque 6 puits et stérilisées à l'éthanol. Les lamelles sont incubées dans les puits avec 2mL d'éthanol 70% (vol/vol) pendant 5 minutes puis elles sont lavées 3 fois avec du PBS 1X stérile. Les cellules microgliales humaines classiques ont étéensemencées dans les puits, 24 heures avant transfection à une concentration de 1.10^5 cellules/mL. Le jour de la transfection, 2µg d'ADN plasmidique final sont dilués dans 200µL de tampon jetPRIME et vortexés 10 secondes. Puis, 4µL de réactif jetPRIME sont ajoutés à l'ADN dilué, vortexés 1 seconde, centrifugés rapidement et incubés 10 minutes à température ambiante. Une fois le temps d'incubation écoulé, les mélanges ADN-jetPRIME sont ajoutés aux cellules. Le milieu est remplacé 4h après la transfection.

2.7. Méthode d'étude des cellules

2.7.1. Microscopie

Les expériences de microscopie sont réalisées sur des cellules microgliales humaines classiques, ensemencées dans des plaques 6 puits sur des lamelles de verre stérilisées au préalable. Les cellules sont transfectées à l'aide du jetPRIME, comme décrit dans la partie 2.6.2.2. Deux protocoles de microscopie différents ont été appliqués, le premier faisant intervenir des vecteurs plasmidiques qui codent pour nos protéines d'intérêt couplées à des protéines fluorescentes, le second faisant intervenir l'immunofluorescence. Une fois les lames de microscopie finalisées, les images sont réalisées avec un microscope confocal Leica SPE.

2.7.1.1. Protocole de microscopie avec transfection de vecteur-protéine fluorescente

Vingt-quatre heures après la transfection, le milieu est retiré des puits et les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X. Les cellules sont ensuite fixées avec du PFA 4% pendant 10 minutes à température ambiante, dans l'obscurité et sous agitation.

Puis, les cellules sont à nouveau lavées 3 fois avec du PBS 1X. Les noyaux des cellules sont ensuite colorés avec du Hoechst (dilué au 2000^e dans du PBS 1X) pendant 1 minutes à température ambiante, dans l'obscurité et sous agitation. Trois lavages au PBS 1X sont réalisés. Enfin, les lamelles sont déposées sur des lames sur lesquelles du milieu de montage a été déposé. Les lames sont ensuite laissées 24 heures dans l'obscurité et enfin scellées avec du vernis transparent.

2.7.1.2. Immunofluorescence

Vingt-quatre heures après avoirensemencé les cellules à une concentration de 1.10^5 cellules/mL dans des plaques 6 puits contenant des lamelles de microscopie, le milieu est retiré des cellules et elles sont lavées deux fois avec du PBS 1X. Les cellules sont ensuite fixées avec du PFA 4% pendant 10 minutes à température ambiante, dans l'obscurité et sous agitation. Puis, les cellules sont à nouveau lavées 3 fois avec du PBS 1X pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec 0,2% de triton pendant 10 minutes à température ambiante, dans l'obscurité et sous agitation. Les cellules sont à nouveau lavées 3 fois avec du PBS 1X. Puis elles sont incubées avec une solution de BSA 2% pendant 1 heure, sous agitation et dans l'obscurité. Les cellules sont ensuite mises en contact avec des anticorps primaires dilués dans une solution de BSA 4% pendant 1 heure. Suite à 3 lavages PBS 1X, les anticorps secondaires sont déposés sur les lamelles pendant 1 heure. Puis, les lamelles sont lavées 3 fois avec du PBS 1X. Les noyaux des cellules sont ensuite colorés avec du Hoechst (dilué au 2000^e dans du PBS 1X) pendant 1 minute à température ambiante, dans l'obscurité et sous agitation. Trois lavages au PBS 1X sont réalisés. Enfin, les lamelles sont déposées sur les lames sur lesquelles du milieu de montage a été déposé. Les lames sont ensuite laissées 24 heures dans l'obscurité et enfin scellées avec du vernis transparent.

2.7.2. Cytométrie en flux

Les cellules microgliales utilisées dans cette analyse seront nommées CHME5 ou CHME5-HIV. Ces cellules microgliales humaines contiennent le génome du VIH-1 muté dans le gène Gag et le gène de la GFP intégré dans le génome viral. Lorsque les cellules sont cultivées classiquement elles sont à l'état latent, c'est à dire que ni le

génom viral ni la GFP ne s'expriment. La réactivation de l'expression du génome du VIH-1 par différentes molécules est suivi par cytométrie en flux.

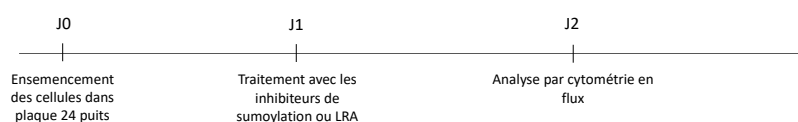
Les cellules CHME5 (contrôle : cellules sans génome HIV ni GFP) ou CHME5-HIV sont ensemencées dans des plaques 24 puits, 24 heures avant le premier traitement à une concentration de $1,5 \cdot 10^5$ cellules/mL à raison de 500 μ L. Un jour après, les cellules sont traitées avec les différentes molécules inhibitrices (Tableau 4). Un témoin positif de réactivation est ajouté, il est constitué de cellules traitées avec 17,5nM de romidepsine (inhibiteur de HDAC). Une condition avec des cellules non traitées est également ajoutée ainsi qu'une condition « mock » ou « solvant ». Si un deuxième traitement est effectué, un lavage au PBS 1X stérile est réalisé entre les deux traitements. Les différents protocoles sont présentés dans la figure 32. Vingt-quatre heures après le dernier traitement, les cellules sont décollées du support par trypsinisation, 2 lavages des cellules au PBS 1X stérile sont réalisés. Enfin, les cellules sont resuspendues dans 300 μ L de PBS 1X stérile et les échantillons sont soumis au cytomètre en flux.

La cytométrie en flux repose sur l'analyse des différentes caractéristiques des cellules. Elles vont passer une à une devant des lasers qui excitent les fluorochromes (ici GFP) qui émettront ensuite un signal lumineux qui sera réceptionné par des capteurs puis analysé et retranscrit en données numériques. Pour notre étude, une méthode d'analyse spécifique a été mise en place (Figure 33). Tout d'abord les cellules sont sélectionnées en fonction de leur taille (FSC) et de leur granulométrie (SSC) (Fig33 A). Puis un tri est effectué entre les cellules uniques et les cellules qui peuvent former des agrégats, notamment du fait qu'elles sont adhérentes (Fig33, B). Seuls les résultats des cellules uniques sélectionnées par leur taille/granulométrie seront projetés sur les deux graphiques (Figure 33 C et D). Enfin, les résultats sont normalisés avec le contrôle mock et les synergies sont calculées en faisant le rapport de cellules GFP + des molécules testées ensemble sur les deux valeurs de GFP pour chaque molécule analysée seule ($GFP\ A+B / (GFP\ A + GFP\ B)$).

Molécule	Référence	Solvant	[] stock	[] finales		
Romidepsine	Sigma Aldrich SML 1175	DMSO	1mM	17,5nM	1,75nM	
SAHA	Sigma Aldrich SML0061-5MG	DMSO	1mM	2 µM		
Acide tannique	Sigma Aldrich 403040	Eau distillée	100mM	10µM	20µM	
2D08	Sigma Aldrich SML1052	DMSO	25mM	20µM		
COH000	MCE HY-114304	DMSO	10mM	10µM	1µM	
ML792	MCE HY-108702	DMSO	10mM	10µM	1µM	0,5µM

Tableau 4 : Molécules testées lors des expériences de cytométrie en flux sur le modèle de cellules microgliales infectées latentes par le VIH-1.

Traitement simple :



Co-traitement :



Traitement séquentiel :



Figure 32 : Schéma du protocole pour les traitements des cellules CHME5-HIV avec les différentes molécules pour les expériences de réactivation en cytométrie en flux.

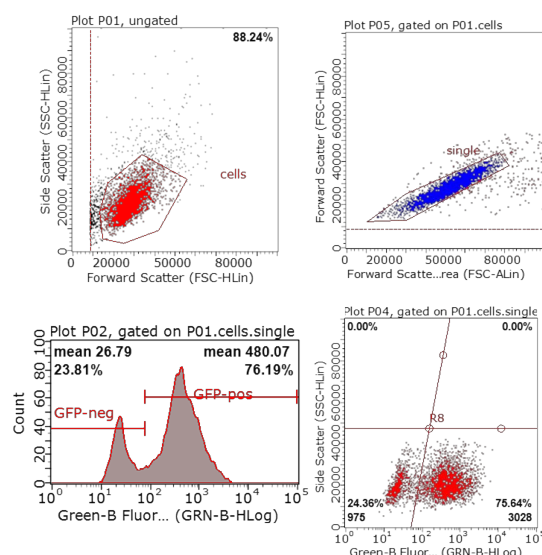


Figure 33 : Méthode de cytométrie en flux utilisée pour analyser les expériences de réactivation (CHME5-HIV).

2.7.3. Test de survie cellulaire

Les cellules sont ensemencées la veille de l'essai dans des plaques 96 puits à une concentration de $5 \cdot 10^4$ cellules/mL dans du milieu DMEM sans rouge de phénol (RF). Le jour de l'essai, les cellules sont traitées avec les différentes molécules inhibitrices (Tableau 4). Un contrôle positif de viabilité constitué des cellules cultivées dans du milieu est réalisé. Un contrôle négatif correspondant à un traitement des cellules avec 100% de DMSO est également réalisé. Après 24 heures de traitement, 10 μ L de réactif MTT 12mM (Thermofisher Invitrogen M6494) sont ajoutés aux cellules pendant 4 heures à 37°C et 5%CO₂. Puis un mélange de 100 μ L d'isopropanol 100% + 4 μ L d'HCl 1M est ajouté dans chaque puits. La plaque est incubée pendant 30 minutes sous agitation. Puis l'absorbance est mesurée à 550nm à l'aide du spectrophotomètre Glomax. Un blanc est réalisé avec du milieu de culture sans RF, le réactif MTT et le mélange isopropanol/HCl. Les résultats obtenus pour les inhibiteurs sont comparés au contrôle de viabilité positif (cellules + DMEM) qui correspond à 100% de viabilité.

Bibliographie

- Ahluwalia, J.K., Khan, S.Z., Soni, K., Rawat, P., Gupta, A., Hariharan, M., Scaria, V., Lalwani, M., Pillai, B., Mitra, D., et al. (2008). Human cellular microRNA hsa-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication. *Retrovirology* 5, 117.
- Ait-Ammar, A., Bellefroid, M., Daouad, F., Martinelli, V., Van Assche, J., Wallet, C., Rodari, A., De Rovere, M., Fahrenkrog, B., Schwartz, C., et al. (2021). Inhibition of HIV-1 gene transcription by KAP1 in myeloid lineage. *Sci. Rep.* 11, 2692.
- Aksenov, M.Y., Aksenova, M.V., Mactutus, C.F., and Booze, R.M. (2009). Attenuated neurotoxicity of the transactivation-defective HIV-1 Tat protein in hippocampal cell cultures. *Exp. Neurol.* 219, 586–590.
- Ali, A., Raja, R., Farooqui, S.R., Ahmad, S., and Banerjee, A.C. (2017). USP7 deubiquitinase controls HIV-1 production by stabilizing Tat protein. *Biochem. J.* 474, 1653–1668.
- Amini, S., Mameli, G., Del Valle, L., Skowronska, A., Reiss, K., Gelman, B.B., White, M.K., Khalili, K., and Sawaya, B.E. (2005). p73 Interacts with human immunodeficiency virus type 1 Tat in astrocytic cells and prevents its acetylation on lysine 28. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8126–8138.
- Andrade, D., Velinder, M., Singer, J., Maese, L., Bareyan, D., Nguyen, H., Chandrasekharan, M.B., Lucente, H., McClellan, D., Jones, D., et al. (2016). SUMOylation Regulates Growth Factor Independence 1 in Transcriptional Control and Hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* 36, 1438–1450.
- Antinori, A., Arendt, G., Becker, J.T., Brew, B.J., Byrd, D.A., Cherner, M., Clifford, D.B., Cinque, P., Epstein, L.G., Goodkin, K., et al. (2007). Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology* 69, 1789–1799.
- 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., Keedy, K.S., Espeseth, A., Dang, H., Hazuda, D.J., and Margolis, D.M. (2009). Expression of latent human immunodeficiency type 1 is induced by novel and selective histone deacetylase inhibitors. *AIDS Lond. Engl.* 23, 1799–1806.
- 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.
- Avalos, C.R., Abreu, C.M., Queen, S.E., Li, M., Price, S., Shirk, E.N., Engle, E.L., Forsyth, E., Bullock, B.T., Mac Gabhann, F., et al. (2017). Brain Macrophages in Simian Immunodeficiency Virus-Infected, Antiretroviral-Suppressed Macaques: a Functional Latent Reservoir. *MBio* 8, e01186-17.
- Avram, D., Fields, A., Pretty On Top, K., Nevriy, D.J., Ishmael, J.E., and Leid, M. (2000). Isolation of a novel family of C(2)H(2) zinc finger proteins implicated in transcriptional repression mediated by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) orphan nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 10315–10322.
- Avram, D., Fields, A., Senawong, T., Topark-Ngarm, A., and Leid, M. (2002). COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor)-interacting protein 1 (CTIP1) is a sequence-specific DNA binding protein. *Biochem. J.* 368, 555–563.
- Bailey, D., and O'Hare, P. (2005). Comparison of the SUMO1 and ubiquitin conjugation pathways during the inhibition of proteasome activity with evidence of SUMO1 recycling. *Biochem. J.* 392, 271–281.
- Baldauf, H.-M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells.

Nat. Med. 18, 1682–1687.

Banga, R., Procopio, F.A., Noto, A., Pollakis, G., Cavassini, M., Ohmiti, K., Corpataux, J.-M., de Leval, L., Pantaleo, G., and Perreau, M. (2016). PD-1(+) and follicular helper T cells are responsible for persistent HIV-1 transcription in treated aviremic individuals. *Nat. Med.* 22, 754–761.

Barboric, M., Nissen, R.M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., and Peterlin, B.M. (2001). NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* 8, 327–337.

Barillari, G., Sgadari, C., Fiorelli, V., Samaniego, F., Colombini, S., Manzari, V., Modesti, A., Nair, B.C., Cafaro, A., Stürzl, M., et al. (1999). The Tat Protein of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Promotes Vascular Cell Growth and Locomotion by Engaging the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ Integrins and by Mobilizing Sequestered Basic Fibroblast Growth Factor. *Blood* 94, 663–672.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.

Barré-Sinoussi, F., Ross, A.L., and Delfraissy, J.-F. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 877–883.

Bejarano, D.A., Peng, K., Laketa, V., Börner, K., Jost, K.L., Lucic, B., Glass, B., Lusic, M., Müller, B., and Kräusslich, H.-G. (2019). HIV-1 nuclear import in macrophages is regulated by CPSF6-capsid interactions at the nuclear pore complex. *ELife* 8, e41800.

Berro, R., Kehn, K., de la Fuente, C., Pumfery, A., Adair, R., Wade, J., Colberg-Poley, A.M., Hiscott, J., and Kashanchi, F. (2006). Acetylated Tat regulates human immunodeficiency virus type 1 splicing through its interaction with the splicing regulator p32. *J. Virol.* 80, 3189–3204.

Bester, S.M., Wei, G., Zhao, H., Adu-Ampratwum, D., Iqbal, N., Courouble, V.V., Francis, A.C., Annamalai, A.S., Singh, P.K., Shkriabai, N., et al. (2020). Structural and mechanistic bases for a potent HIV-1 capsid inhibitor. *Science* 370, 360–364.

Bilimoria, P.M., and Stevens, B. (2015). Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res.* 1617, 7–17.

Blanco-Rodriguez, G., and Di Nunzio, F. (2021). The Viral Capsid: A Master Key to Access the Host Nucleus. *Viruses* 13, 1178.

Blanco-Rodriguez, G., Gazi, A., Monel, B., Frabetti, S., Scoca, V., Mueller, F., Schwartz, O., Krijnse-Locker, J., Charneau, P., and Di Nunzio, F. (2020).

Remodeling of the Core Leads HIV-1 Preintegration Complex into the Nucleus of Human Lymphocytes. *J. Virol.* 94, e00135-20.

Blazkova, J., Trejbalova, K., Gondois-Rey, F., Halfon, P., Philibert, P., Guiguen, A., Verdin, E., Olive, D., Lint, C.V., Hejnar, J., et al. (2009). CpG Methylation Controls Reactivation of HIV from Latency. *PLOS Pathog.* 5, e1000554.

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., and Lint, C.V. (2019). La latence virale du VIH-1. *Virologie* 23, 195–210.

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.

Boutell, C., Cuchet-Lourenço, D., Vanni, E., Orr, A., Glass, M., McFarlane, S., and Everett, R.D. (2011).

A Viral Ubiquitin Ligase Has Substrate Preferential SUMO Targeted Ubiquitin Ligase Activity that Counteracts Intrinsic Antiviral Defence. *PLOS Pathog.* 7, e1002245.

Brès, V., Kiernan, R.E., Linares, L.K., Chable-Bessia, C., Plechakova, O., Tréand, C., Emiliani, S., Peloponese, J.-M., Jeang, K.-T., Cux, 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.

Brew, B.J. (2004). Evidence for a change in AIDS dementia complex in the era of highly active antiretroviral therapy and the possibility of new forms of AIDS dementia complex. *AIDS Lond. Engl.* 18 Suppl 1, S75-78.

Bruce, J.W., Bracken, M., Evans, E., Sherer, N., and Ahlquist, P. (2021). ZBTB2 represses HIV-1 transcription and is regulated by HIV-1 Vpr and cellular DNA damage responses. *PLoS Pathog.* 17, e1009364.

Bueno, M.T.D., Garcia-Rivera, J.A., Kugelman, J.R., Morales, E., Rosas-Acosta, G., and Llano, M. (2010). SUMOylation of the lens epithelium-derived growth factor/p75 attenuates its transcriptional activity on the heat shock protein 27 promoter. *J. Mol. Biol.* 399, 221–239.

Buffone, C., Martinez-Lopez, A., Fricke, T., Opp, S., Severgnini, M., Cifola, I., Petiti, L., Frabetti, S., Skorupka, K., Zadrozny, K.K., et al. (2018). Nup153 Unlocks the Nuclear Pore Complex for HIV-1 Nuclear Translocation in Nondividing Cells. *J. Virol.* 92, e00648-18.

Burdick, R.C., Hu, W.-S., and Pathak, V.K. (2013). Nuclear import of APOBEC3F-labeled HIV-1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E4780-4789.

Burdick, R.C., Delviks-Frankenberry, K.A., Chen, J., Janaka, S.K., Sastri, J., Hu, W.-S., and Pathak, V.K. (2017). Dynamics and regulation of nuclear import and nuclear movements of HIV-1 complexes. *PLoS Pathog.* 13, e1006570.

Burdick, R.C., Li, C., Munshi, M., Rawson, J.M.O., Nagashima, K., Hu, W.-S., and Pathak, V.K. (2020). HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 5486–5493.

Buzon, M.J., Martin-Gayo, E., Pereyra, F., Ouyang, Z., Sun, H., Li, J.Z., Piovoso, M., Shaw, A., Dalmau, J., Zangger, N., et al. (2014). Long-Term Antiretroviral Treatment Initiated at Primary HIV-1 Infection Affects the Size, Composition, and Decay Kinetics of the Reservoir of HIV-1-Infected CD4 T Cells. *J. Virol.* 88, 10056–10065.

Campbell, E.M., and Hope, T.J. (2015). HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 471–483.

Cassan, E., Arigon-Chifolleau, A.-M., Mesnard, J.-M., Gross, A., and Gascuel, O. (2016). Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 11537–11542.

Castro-Gonzalez, S., Colomer-Lluch, M., and Serra-Moreno, R. (2018). Barriers for HIV Cure: The Latent Reservoir. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 34, 739–759.

Cesana, D., Santoni de Sio, F.R., Rudilosso, L., Gallina, P., Calabria, A., Beretta, S., Merelli, I., Bruzzesi, E., Passerini, L., Nozza, S., et al. (2017). HIV-1-mediated insertional activation of STAT5B and BACH2 trigger viral reservoir in T regulatory cells. *Nat. Commun.* 8, 498.

Cheng, J., Kang, X., Zhang, S., and Yeh, E.T.H. (2007). SUMO-specific Protease 1 is Essential for Stabilization of Hypoxia-inducible factor-1 α During Hypoxia. *Cell* 131, 584–595.

Cherrier, T., Douce, V.L., 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.* 110, 12655–12660.

Cheung, A.C.M., and Cramer, P. (2011). Structural basis of RNA polymerase II backtracking, arrest and

reactivation. *Nature* 471, 249–253.

Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.-R., Ghattas, G., Brechley, J.M., et al. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* 15, 893–900.

Chomont, N., DaFonseca, S., Vandergeeten, C., Ancuta, P., and Sékaly, R.-P. (2011). Maintenance of CD4+ T-cell memory and HIV persistence: keeping memory, keeping HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 30–36.

Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834–840.

Chubb, J.R., Trcek, T., Shenoy, S.M., and Singer, R.H. (2006). Transcriptional Pulsing of a Developmental Gene. *Curr. Biol. CB* 16, 1018–1025.

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

Chun, T.W., Stuyver, L., Mizell, S.B., Ehler, L.A., Mican, J.A., Baseler, M., Lloyd, A.L., Nowak, M.A., and Fauci, A.S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13193–13197.

Churchill, M.J., Gorry, P.R., Cowley, D., Lal, L., Sonza, S., Purcell, D.F.J., Thompson, K.A., Gabuzda, D., McArthur, J.C., Pardo, C.A., et al. (2006). Use of laser capture microdissection to detect integrated HIV-1 DNA in macrophages and astrocytes from autopsy brain tissues. *J. Neurovirol.* 12, 146–152.

Churchill, M.J., Wesselingh, S.L., Cowley, D., Pardo, C.A., McArthur, J.C., Brew, B.J., and Gorry, P.R. (2009). Extensive astrocyte infection is prominent in human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann. Neurol.* 66, 253–258.

Cihlar, T., and Fordyce, M. (2016). Current status and prospects of HIV treatment. *Curr. Opin. Virol.* 18, 50–56.

Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlama, C., and Rouzioux, C. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233, 343–346.

Clements, J.E., Babas, T., Mankowski, J.L., Suryanarayana, K., Piatak, M., Tarwater, P.M., Lifson, J.D., and Zink, M.C. (2002). The central nervous system as a reservoir for simian immunodeficiency virus (SIV): steady-state levels of SIV DNA in brain from acute through asymptomatic infection. *J. Infect. Dis.* 186, 905–913.

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.

Cohn, L.B., Chomont, N., and Deeks, S.G. (2020). The Biology of the HIV-1 Latent Reservoir and Implications for Cure Strategies. *Cell Host Microbe* 27, 519–530.

Colby, D.J., Trautmann, L., Pinyakorn, S., Leyre, L., Pagliuzza, A., Kroon, E., Rolland, M., Takata, H., Buranapraditkun, S., Intasan, J., et al. (2018). Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig I acute HIV infection. *Nat. Med.* 24, 923–926.

Colomer-Lluch, M., and Serra-Moreno, R. (2017). BCA2/Rabring7 Interferes with HIV-1 Proviral Transcription by Enhancing the SUMOylation of IκBα. *J. Virol.* 91, e02098-16.

Colomer-Lluch, M., Castro-Gonzalez, S., and Serra-Moreno, R. (2019). Ubiquitination and SUMOylation in HIV Infection: Friends and Foes. *Curr. Issues Mol. Biol.* 35, 159–194.

Colonna, M., and Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Immunol.* 35, 441–468.

Conaway, J.W., Shilatifard, A., Dvir, A., and Conaway, R.C. (2000). Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 25, 375–380.

Cosenza, M.A., Zhao, M.-L., Si, Q., and Lee, S.C. (2002). Human brain parenchymal microglia express CD14 and CD45 and are productively infected by HIV-1 in HIV-1 encephalitis. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 12, 442–455.

Coull, J.J., Romerio, F., Sun, J.M., Volker, J.L., Galvin, K.M., Davie, J.R., Shi, Y., Hansen, U., and Margolis, D.M. (2000). The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J. Virol.* 74, 6790–6799.

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

Crum-Cianflone, N.F., Moore, D.J., Letendre, S., Poehlman Roediger, M., Eberly, L., Weintrob, A., Ganesan, A., Johnson, E., Del Rosario, R., Agan, B.K., et al. (2013). Low prevalence of neurocognitive impairment in early diagnosed and managed HIV-infected persons. *Neurology* 80, 371–379.

Cullen, B.R., Lomedico, P.T., and Ju, G. (1984). Transcriptional interference in avian retroviruses--implications for the promoter insertion model of leukaemogenesis. *Nature* 307, 241–245.

Cysique, L.A., Jugé, L., Lennon, M.J., Gates, T.M., Jones, S.P., Lovelace, M.D., Rae, C.D., Johnson, T.P., Nath, A., and Brew, B.J. (2019). HIV brain latency as measured by CSF BcL11b relates to disrupted brain cellular energy in virally suppressed HIV infection. *AIDS Lond. Engl.* 33, 433–441.

Davey, R.T., Bhat, N., Yoder, C., Chun, T.W., Metcalf, J.A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R.A., Adelsberger, J.W., Miller, K.D., et al. (1999). HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 15109–15114.

De Breyne, S., and Ohlmann, T. (2019). Focus on Translation Initiation of the HIV-1 mRNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 101.

Deeks, S.G., and Walker, B.D. (2007). Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 27, 406–416.

Deeks, S.G., Lewin, S.R., Ross, A.L., Ananworanich, J., Benkirane, M., Cannon, P., Chomont, N., Douek, D., Lifson, J.D., Lo, Y.-R., et al. (2016). International AIDS Society global scientific strategy: towards an HIV cure 2016. *Nat. Med.* 22, 839–850.

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

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., Rodriguez, M., and Hay, R. (1998). SUMO-1 Modification of I κ B α Inhibits NF- κ B Activation. *Mol. Cell* 2, 233–239.

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.

- Dhall, A., Weller, C.E., Chu, A., Shelton, P.M.M., and Chatterjee, C. (2017). Chemically Sumoylated Histone H4 Stimulates Intranucleosomal Demethylation by the LSD1-CoREST Complex. *ACS Chem. Biol.* **12**, 2275–2280.
- Dharan, A., and Campbell, E.M. (2018). Role of Microtubules and Microtubule-Associated Proteins in HIV-1 Infection. *J. Virol.* **92**, e00085-18.
- Dharan, A., Opp, S., Abdel-Rahim, O., Keceli, S.K., Imam, S., Diaz-Griffero, F., and Campbell, E.M. (2017). Bicaudal D2 facilitates the cytoplasmic trafficking and nuclear import of HIV-1 genomes during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E10707–E10716.
- Di Nunzio, F., Danckaert, A., Fricke, T., Perez, P., Fernandez, J., Perret, E., Roux, P., Shorte, S., Charneau, P., Diaz-Griffero, F., et al. (2012). Human nucleoporins promote HIV-1 docking at the nuclear pore, nuclear import and integration. *PLoS One* **7**, e46037.
- Di Nunzio, F., Fricke, T., Miccio, A., Valle-Casuso, J.C., Perez, P., Souque, P., Rizzi, E., Severgnini, M., Mavilio, F., Charneau, P., et al. (2013). Nup153 and Nup98 bind the HIV-1 core and contribute to the early steps of HIV-1 replication. *Virology* **440**, 8–18.
- Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M.J., Green, S.M., Heaphy, S., Karn, J., Lowe, A.D., Singh, M., Skinner, M.A., and Valerio, R. (1989). Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6925–6929.
- Dinosa, J.B., Kim, S.Y., Wiegand, A.M., Palmer, S.E., Gange, S.J., Cranmer, L., O'Shea, A., Callender, M., Spivak, A., Brennan, T., et al. (2009). Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 9403–9408.
- 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.
- Dore, G.J., Correll, P.K., Li, Y., Kaldor, J.M., Cooper, D.A., and Brew, B.J. (1999). Changes to AIDS dementia complex in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Lond. Engl.* **13**, 1249–1253.
- Dorr, A., Kiermer, V., Pedal, A., Rackwitz, H.-R., Henklein, P., Schubert, U., Zhou, M.-M., Verdin, E., and Ott, M. (2002). Transcriptional synergy between Tat and PCAF is dependent on the binding of acetylated Tat to the PCAF bromodomain. *EMBO J.* **21**, 2715–2723.
- Droescher, M., Begitt, A., Marg, A., Zacharias, M., and Vinkemeier, U. (2017). Cytokine-induced paracrystals prolong the activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) and provide a model for the regulation of protein solubility by small ubiquitin-like modifier (SUMO). *J. Biol. Chem.* **292**, 10317.
- Dubuissez, M., Loison, I., Paget, S., Vorng, H., Ait-Yahia, S., Rohr, O., Tsicopoulos, A., and Leprince, D. (2016). PKC-mediated phosphorylation of BCL11B at Serine 2 negatively regulates its interaction with NuRD complexes during CD4+ T cell activation. *Mol. Cell. Biol.* **36**, MCB.00062-16.
- Dufour, C., Gantner, P., Fromentin, R., and Chomont, N. (2020). The multifaceted nature of HIV latency. *J. Clin. Invest.* **130**, 3381–3390.
- Dutrieux, J., Portilho, D.M., Arhel, N.J., Hazan, U., and Nisole, S. (2015). TRIM5α is a SUMO substrate. *Retrovirology* **12**, 28.
- Eggers, C., Arendt, G., Hahn, K., Husstedt, I.W., Maschke, M., Neuen-Jacob, E., Obermann, M., Rosenkranz, T., Schielke, E., Straube, E., et al. (2017). HIV-1-associated neurocognitive disorder: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J. Neurol.* **264**, 1715–1727.
- Eilebrecht, S., Le Douce, V., Riclet, R., Targat, B., Hallay, H., Van Driessche, B., Schwartz, C., Robette, G., Van Lint, C., Rohr, O., et al. (2014). HMGA1 recruits CTIP2-repressed P-TEFb to the HIV-1 and cellular target promoters. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4962–4971.

Eisele, E., and Siliciano, R.F. (2012). Redefining the Viral Reservoirs that Prevent HIV-1 Eradication. *Immunity* 37, 377–388.

Ellery, P.J., Tippet, E., Chiu, Y.-L., Paukovics, G., Cameron, P.U., Solomon, A., Lewin, S.R., Gorry, P.R., Jaworowski, A., Greene, W.C., et al. (2007). The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 6581–6589.

Engelman, A., and Cherepanov, P. (2008). The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog.* 4, e1000046.

Engelman, A.N., and Singh, P.K. (2018). Cellular and molecular mechanisms of HIV-1 integration targeting. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 2491–2507.

Faria, N.R., Rambaut, A., Suchard, M.A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M.J., Tatem, A.J., Sousa, J.D., Arinaminpathy, N., P  pin, J., et al. (2014). HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science* 346, 56–61.

Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., et al. (1997). Identification of a Reservoir for HIV-1 in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Science* 278, 1295–1300.

Finzi, D., Blankson, J., Siliciano, J.D., Margolick, J.B., Chadwick, K., Pierson, T., Smith, K., Lisiewicz, J., Lori, F., Flexner, C., et al. (1999). Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* 5, 512–517.

Fiorelli, V., Barillari, G., Toschi, E., Sgadari, C., Monini, P., St  rzi, M., and Ensoli, B. (1999). IFN-   Induces Endothelial Cells to Proliferate and to Invade the Extracellular Matrix in Response to the HIV-1 Tat Protein: Implications for AIDS-Kaposi's Sarcoma Pathogenesis. *J. Immunol.* 162, 1165–1170.

Forouzanfar, F., Ali, S., Wallet, C., Rovere, M.D., Ducloy, C., Mekdad, H.E., Maassarani, M.E., A  t-Ammar, A., Van Assche, J., Boutant, E., et al. (2019). HIV-1 Vpr mediates the depletion of the cellular repressor CTIP2 to counteract viral gene silencing. *Sci. Rep.* 9, 1–10.

Fouchier, R.A., Groenink, M., Kootstra, N.A., Tersmette, M., Huisman, H.G., Miedema, F., and Schuitemaker, H. (1992). Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J. Virol.* 66, 3183–3187.

Francis, A.C., Marin, M., Singh, P.K., Achuthan, V., Prellberg, M.J., Palerm  no-Rowland, K., Lan, S., Tedbury, P.R., Sarafianos, S.G., Engelman, A.N., et al. (2020). HIV-1 replication complexes accumulate in nuclear speckles and integrate into speckle-associated genomic domains. *Nat. Commun.* 11, 3505.

Frankel, A.D., and Young, J.A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 1–25.

Freed, E.O. (2015). 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. *J. Virol.* 85, 9078–9089.

Fryrear, K.A., Guo, X., Kerscher, O., and Semmes, O.J. (2012). The Sumo-targeted ubiquitin ligase RNF4 regulates the localization and function of the HTLV-1 oncoprotein Tax. *Blood* 119, 1173–1181.

Fukazawa, Y., Lum, R., Okoye, A.A., Park, H., Matsuda, K., Bae, J.Y., Hagen, S.I., Shoemaker, R., Deleage, C., Lucero, C., et al. (2015). B cell follicle sanctuary permits persistent productive simian immunodeficiency virus infection in elite controllers. *Nat. Med.* 21, 132–139.

Galanty, Y., Belotserkovskaya, R., Coates, J., and Jackson, S.P. (2012). RNF4, a SUMO-targeted ubiquitin E3 ligase, promotes DNA double-strand break repair. *Genes Dev.* 26, 1179–1195.

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.

Gama, L., Abreu, C.M., Shirk, E.N., Price, S.L., Li, M., Laird, G.M., Pate, K.A.M., Wietgreffe, S.W., O'Connor, S.L., Pianowski, L., et al. (2017). Reactivation of simian immunodeficiency virus reservoirs in the brain of virally suppressed macaques. *AIDS Lond. Engl.* 31, 5–14.

Gandhi, N.S., Moxley, R.T., Creighton, J., Roosa, H.V., Skolasky, R.L., Selnes, O.A., McArthur, J., and Sacktor, N. (2010a). Comparison of scales to evaluate the progression of HIV-associated neurocognitive disorder. *HIV Ther.* 4, 371–379.

Gandhi, R.T., Zheng, L., Bosch, R.J., Chan, E.S., Margolis, D.M., Read, S., Kallungal, B., Palmer, S., Medvik, K., Lederman, M.M., et al. (2010b). The Effect of Raltegravir Intensification on Low-level Residual Viremia in HIV-Infected Patients on Antiretroviral Therapy: A Randomized Controlled Trial. *PLOS Med.* 7, e1000321.

Ganser-Pornillos, B.K., Yeager, M., and Pornillos, O. (2012). Assembly and architecture of HIV. *Adv. Exp. Med. Biol.* 726, 441–465.

Gantner, P., Pagliuzza, A., Pardons, M., Ramgopal, M., Routy, J.-P., Fromentin, R., and Chomont, N. (2020). Single-cell TCR sequencing reveals phenotypically diverse clonally expanded cells harboring inducible HIV proviruses during ART. *Nat. Commun.* 11, 4089.

Garcia, J.A., Harrich, D., Soultanakis, E., Wu, F., Mitsuyasu, R., and Gaynor, R.B. (1989). Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation. *EMBO J.* 8, 765–778.

García, M., Buzón, M.J., Benito, J.M., and Rallón, N. (2018). Peering into the HIV reservoir. *Rev. Med. Virol.* 28, e1981.

Gareau, J.R., and Lima, C.D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 861–871.

Gartner, S., Markovits, P., Markovitz, D.M., Kaplan, M.H., Gallo, R.C., and Popovic, M. (1986). The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233, 215–219.

Geiss-Friedlander, R., and Melchior, F. (2007). Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 947–956.

Geoffroy, M.-C., and Hay, R.T. (2009). An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 564–568.

Ginsberg, S.D., Alldred, M.J., Gunnam, S.M., Schirotli, C., Lee, S.H., Morgello, S., and Fischer, T. (2018). Expression profiling suggests microglial impairment in human immunodeficiency virus neuropathogenesis. *Ann. Neurol.* 83, 406–417.

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.

González-Prieto, R., Cuijpers, S.A., Kumar, R., Hendriks, I.A., and Vertegaal, A.C. (2015). c-Myc is targeted to the proteasome for degradation in a SUMOylation-dependent manner, regulated by PIAS1, SENP7 and RNF4. *Cell Cycle* 14, 1859–1872.

González-Scarano, F., and Martín-García, J. (2005). The neuropathogenesis of AIDS. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 69–81.

Gorry, P.R., Ong, C., Thorpe, J., Bannwarth, S., Thompson, K.A., Gatignol, A., Vesselingh, S.L., and

- Purcell, D.F.J. (2003). Astrocyte infection by HIV-1: mechanisms of restricted virus replication, and role in the pathogenesis of HIV-1-associated dementia. *Curr. HIV Res.* 1, 463–473.
- Gosselin, A., Monteiro, P., Chomont, N., Diaz-Griffero, F., Said, E.A., Fonseca, S., Wacleche, V., El-Far, M., Boulassel, M.-R., Routy, J.-P., et al. (2010). Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 1604–1616.
- Graf, E.H., Pace, M.J., Peterson, B.A., Lynch, L.J., Chukwulebe, S.B., Mexas, A.M., Shaheen, F., Martin, J.N., Deeks, S.G., Connors, M., et al. (2013). Gag-positive reservoir cells are susceptible to HIV-specific cytotoxic T lymphocyte mediated clearance in vitro and can be detected in vivo [corrected]. *PloS One* 8, e71879.
- Gras, G., and Kaul, M. (2010). Molecular mechanisms of neuroinvasion by monocytes-macrophages in HIV-1 infection. *Retrovirology* 7, 30.
- 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.
- Hatano, H., Hayes, T.L., Dahl, V., Sinclair, E., Lee, T.-H., Hoh, R., Lampiris, H., Hunt, P.W., Palmer, S., McCune, J.M., et al. (2011). A Randomized, Controlled Trial of Raltegravir Intensification in Antiretroviral-treated, HIV-infected Patients with a Suboptimal CD4+ T Cell Response. *J. Infect. Dis.* 203, 960–968.
- Hayashi, T., Seki, M., Maeda, D., Wang, W., Kawabe, Y., Seki, T., Saitoh, H., Fukagawa, T., Yagi, H., and Enomoto, T. (2002). Ubc9 is essential for viability of higher eukaryotic cells. *Exp. Cell Res.* 280, 212–221.
- Heaton, R.K., Clifford, D.B., Franklin, D.R., Woods, S.P., Ake, C., Vaida, F., Ellis, R.J., Letendre, S.L., Marcotte, T.D., Atkinson, J.H., et al. (2010). HIV-associated neurocognitive disorders persist in the era of potent antiretroviral therapy: CHARTER Study. *Neurology* 75, 2087–2096.
- Hendriks, I.A., and Vertegaal, A.C.O. (2016). A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 581–595.
- Hendriks, I.A., Treffers, L.W., Verlaan-de Vries, M., Olsen, J.V., and Vertegaal, A.C.O. (2015). SUMO-2 Orchestrates Chromatin Modifiers in Response to DNA Damage. *Cell Rep.* 10, 1778–1791.
- Henrich, T.J., Hobbs, K.S., Hanhauser, E., Scully, E., Hogan, L.E., Robles, Y.P., Leadabrand, K.S., Marty, F.M., Palmer, C.D., Jost, S., et al. (2017). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Persistence Following Systemic Chemotherapy for Malignancy. *J. Infect. Dis.* 216, 254–262.
- Hermankova, M., Siliciano, J.D., Zhou, Y., Monie, D., Chadwick, K., Margolick, J.B., Quinn, T.C., and Siliciano, R.F. (2003). Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression in Latently Infected Resting CD4+ T Lymphocytes In Vivo. *J. Virol.* 77, 7383–7392.
- Herrmann, C.H., and Rice, A.P. (1993). Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase. *Virology* 197, 601–608.
- Hetzer, C., Dormeyer, W., Schnölzer, M., and Ott, M. (2005). Decoding Tat: the biology of HIV Tat posttranslational modifications. *Microbes Infect.* 7, 1364–1369.
- Hickey, C.M., Wilson, N.R., and Hochstrasser, M. (2012). Function and regulation of SUMO proteases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 755–766.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H.A., Fujimoto, M., Palvimo, J.J., Nakai, A., and Sistonen, L. (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 45–50.
- Hilditch, L., and Towers, G.J. (2014). A model for cofactor use during HIV-1 reverse transcription and

nuclear entry. *Curr. Opin. Virol.* 4, 32–36.

Honeycutt, J.B., Thayer, W.O., Baker, C.E., Ribeiro, R.M., Lada, S.M., Cao, Y., Cleary, R.A., Hudgens, M.G., Richman, D.D., and Garcia, J.V. (2017). HIV persistence in tissue macrophages of humanized myeloid-only mice during antiretroviral therapy. *Nat. Med.* 23, 638–643.

Hong, S., and Banks, W.A. (2015). Role of the immune system in HIV-associated neuroinflammation and neurocognitive implications. *Brain. Behav. Immun.* 45, 1–12.

Hosmane, N.N., Kwon, K.J., Bruner, K.M., Capoferri, A.A., Beg, S., Rosenbloom, D.I.S., Keele, B.F., Ho, Y.-C., Siliciano, J.D., and Siliciano, R.F. (2017). Proliferation of latently infected CD4⁺ T cells carrying replication-competent HIV-1: Potential role in latent reservoir dynamics. *J. Exp. Med.* 214, 959–972.

Hu, W.-S., and Hughes, S.H. (2012). HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006882.

Hua, G., Paulen, L., and Chambon, P. (2016). GR SUMOylation and formation of an SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 repressing complex is mandatory for GC-induced IR nGRE-mediated transrepression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, E626-634.

Huang, J., Wang, F., Argyris, E., Chen, K., Liang, Z., Tian, H., Huang, W., Squires, K., Verlinghieri, G., and Zhang, H. (2007). Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4⁺ T lymphocytes. *Nat. Med.* 13, 1241–1247.

Hwang, S.S., Boyle, T.J., Lyerly, H.K., and Cullen, B.R. (1991). Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 253, 71–74.

Igarashi, T., Brown, C.R., Endo, Y., Buckler-White, A., Plishka, R., Bischofberger, N., Hirsch, V., and Martin, M.A. (2001). Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4⁺ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 658–663.

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.

Imbert, F., and Langford, D. (2021). Viruses, SUMO, and immunity: the interplay between viruses and the host SUMOylation system. *J. Neurovirol.* 27, 531–541.

International AIDS Society Scientific Working Group on HIV Cure, Deeks, S.G., Autran, B., Berkhout, B., Benkirane, M., Cairns, S., Chomont, N., Chun, T.-W., Churchill, M., Di Mascio, M., et al. (2012). Towards an HIV cure: a global scientific strategy. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 607–614.

Iwamoto, A., Hosoya, N., and Kawana-Tachikawa, A. (2010). HIV-1 tropism. *Protein Cell* 1, 510–513.

Jaafoura, S., de Goër de Herve, M.G., Hernandez-Vargas, E.A., Hendel-Chavez, H., Abdoh, M., Mateo, M.C., Krzysiek, R., Merad, M., Seng, R., Tardieu, M., et al. (2014). Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated CD4⁺ memory T Cells. *Nat. Commun.* 5, 5407.

Jones, K.A., and Peterlin, B.M. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 717–743.

Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Luciw, P.A., and Tjian, R. (1986). Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* 232, 755–759.

Josefsson, L., Stockenstrom, S. von, Faria, N.R., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., Epling, L., Tan, A., Ho, T., Lemey, P., et al. (2013). The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E4987–

E4996.

Kaehlcke, K., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Kiermer, V., Henklein, P., Schnoelzer, M., Loret, E., Cole, P.A., Verdin, E., and Ott, M. (2003). Acetylation of Tat defines a cyclinT1-independent step in HIV transactivation. *Mol. Cell* 12, 167–176.

Kalantari, P., Narayan, V., Natarajan, S.K., Muralidhar, K., Gandhi, U.H., Vunta, H., Henderson, A.J., and Prabhu, K.S. (2008). Thioredoxin reductase-1 negatively regulates HIV-1 transactivating protein Tat-dependent transcription in human macrophages. *J. Biol. Chem.* 283, 33183–33190.

Kamitani, T., Nguyen, H.P., and Yeh, E.T. (1997). Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule. *J. Biol. Chem.* 272, 14001–14004.

Karn, J. (2011). The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 4–11.

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.

Kearney, M.F., Wiegand, A., Shao, W., McManus, W.R., Bale, M.J., Luke, B., Maldarelli, F., Mellors, J.W., and Coffin, J.M. (2017). Ongoing HIV Replication During ART Reconsidered. *Open Forum Infect. Dis.* 4, ofx173.

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.

Kenneth, M. (2011). *Janeway's Immunobiology* (Garland Science).

Kessing, C.F., Nixon, C.C., Li, C., Tsai, P., Takata, H., Mousseau, G., Ho, P.T., Honeycutt, J.B., Fallahi, M., Trautmann, L., et al. (2017). In Vivo Suppression of HIV Rebound by Didehydro-Cortistatin A, a “Block-and-Lock” Strategy for HIV-1 Treatment. *Cell Rep.* 21, 600–611.

Kiernan, R.E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K.T., et al. (1999). HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J.* 18, 6106–6118.

Kim, Y.-E., and Ahn, J.-H. (2015). Positive Role of Promyelocytic Leukemia Protein in Type I Interferon Response and Its Regulation by Human Cytomegalovirus. *PLOS Pathog.* 11, e1004785.

Ko, A., Kang, G., Hattler, J.B., Galadima, H.I., Zhang, J., Li, Q., and Kim, W.-K. (2019). Macrophages but not Astrocytes Harbor HIV DNA in the Brains of HIV-1-Infected Aviremic Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. Neuroimmune Pharmacol.* 14, 110–119.

Koenig, S., Gendelman, H.E., Orenstein, J.M., Dal Canto, M.C., Pezeshkpour, G.H., Yungbluth, M., Janotta, F., Aksamit, A., Martin, M.A., and Fauci, A.S. (1986). Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233, 1089–1093.

Kruman, I.I., Nath, A., and Mattson, M.P. (1998). HIV-1 protein Tat induces apoptosis of hippocampal neurons by a mechanism involving caspase activation, calcium overload, and oxidative stress. *Exp. Neurol.* 154, 276–288.

Kula, A., Guerra, J., Knezevich, A., Kleva, D., Myers, M.P., and Marcello, A. (2011). Characterization of the HIV-1 RNA associated proteome identifies Matrins 3 as a nuclear cofactor of Rev function. *Retrovirology* 8, 60.

Kulpa, D.A., and Chomont, N. HIV persistence in the setting of antiretroviral therapy: when, where and how does HIV hide? *J. Virus Erad.* 1, 59–68.

- Kumar, R., and Sabapathy, K. (2019). RNF4-A Paradigm for SUMOylation-Mediated Ubiquitination. *Proteomics* 19, e1900185.
- Kumar, A., Abbas, W., and Herbein, G. (2014). HIV-1 Latency in Monocytes/Macrophages. *Viruses* 6, 1837–1860.
- Lamers, S.L., Salemi, M., Galligan, D.C., Morris, A., Gray, R., Fogel, G., Zhao, L., and McGrath, M.S. (2010). Human immunodeficiency virus-1 evolutionary patterns associated with pathogenic processes in the brain. *J. Neurovirol.* 16, 230–241.
- Lapenta, V., Chiurazzi, P., van der Spek, P., Pizzuti, A., Hanaoka, F., and Brahe, C. (1997). SMT3A, a Human Homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 Gene, Maps to Chromosome 21qter and Defines a Novel Gene Family. *Genomics* 40, 362–366.
- Lassen, K.G., Bailey, J.R., and Siliciano, R.F. (2004). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 transcriptional elongation in resting CD4⁺ T cells in vivo. *J. Virol.* 78, 9105–9114.
- 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.
- Lata, S., Mishra, R., and Banerjee, A.C. (2018). Proteasomal Degradation Machinery: Favorite Target of HIV-1 Proteins. *Front. Microbiol.* 9, 2738.
- Le Douce, V., Herbein, G., Rohr, O., and Schwartz, C. (2010). Molecular mechanisms of HIV-1 persistence in the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* 7, 32.
- 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. (2014). CTIP2, a multifunctional protein: cellular physiopathology and therapeutic implications. *Med. Sci. MS* 30, 797–802.
- Le Rouzic, E., Morel, M., Ayinde, D., Belaïdouni, N., Letienne, J., Transy, C., and Margottin-Goguet, F. (2008). Assembly with the Cul4A-DDB1/DCAF1 ubiquitin ligase protects HIV-1 Vpr from proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 283, 21686–21692.
- Lederman, M.M., and Margolis, L. (2008). The lymph node in HIV pathogenesis. *Semin. Immunol.* 20, 187–195.
- Lee, B., Sharron, M., Montaner, L.J., Weissman, D., and Doms, R.W. (1999). Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5215–5220.
- Lee, Y.-K., Thomas, S.N., Yang, A.J., and Ann, D.K. (2007). 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.
- Lelek, M., Casartelli, N., Pellin, D., Rizzi, E., Souque, P., Severgnini, M., Di Serio, C., Fricke, T., Diaz-Griffero, F., Zimmer, C., et al. (2015). Chromatin organization at the nuclear pore favours HIV replication. *Nat. Commun.* 6, 6483.
- Lenasi, T., Contreras, X., and Peterlin, B.M. (2008). Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency. *Cell Host Microbe* 4, 123–133.
- Letendre, S., Marquie-Beck, J., Capparelli, E., Best, B., Clifford, D., Collier, A.C., Gelman, B.B., McArthur, J.C., McCutchan, J.A., Morgello, S., et al. (2008). Validation of the CNS Penetration-Effectiveness rank for quantifying antiretroviral penetration into the central nervous system. *Arch. Neurol.* 65, 65–70.

- Li, C., Burdick, R.C., Nagashima, K., Hu, W.-S., and Pathak, V.K. (2021). HIV-1 cores retain their integrity until minutes before uncoating in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**.
- 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**, e123605.
- Li, R., Wang, L., Liao, G., Guzzo, C.M., Matunis, M.J., Zhu, H., and Hayward, S.D. (2012b). SUMO Binding by the Epstein-Barr Virus Protein Kinase BGLF4 Is Crucial for BGLF4 Function. *J. Virol.* **86**, 5412–5421.
- Li, W., Huang, Y., Reid, R., Steiner, J., Malpica-Llanos, T., Darden, T.A., Shankar, S.K., Mahadevan, A., Satishchandra, P., and Nath, A. (2008). NMDA receptor activation by HIV-Tat protein is clade dependent. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 12190–12198.
- Liang, Y.-C., Lee, C.-C., Yao, Y.-L., Lai, C.-C., Schmitz, M.L., and Yang, W.-M. (2016). SUMO5, a Novel Poly-SUMO Isoform, Regulates PML Nuclear Bodies. *Sci. Rep.* **6**, 26509.
- Limsirichai, P., Gaj, T., and Schaffer, D.V. (2016). CRISPR-mediated Activation of Latent HIV-1 Expression. *Mol. Ther.* **24**, 499–507.
- Liu, X., Wang, Q., Chen, W., and Wang, C. (2013a). Dynamic regulation of innate immunity by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* **24**, 559–570.
- Liu, X., Chen, W., Wang, Q., Li, L., and Wang, C. (2013b). Negative Regulation of TLR Inflammatory Signaling by the SUMO-deconjugating Enzyme SENP6. *PLOS Pathog.* **9**, e1003480.
- Llano, M., Saenz, D.T., Meehan, A., Wongthida, P., Peretz, M., Walker, W.H., Teo, W., and Poeschla, E.M. (2006). An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science* **314**, 461–464.
- Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H.R., Bedford, T., Kim, E.-Y., Archer, J., Kosakovsky Pond, S.L., Chung, Y.-S., Penugonda, S., Chipman, J.G., Fletcher, C.V., et al. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* **530**, 51–56.
- Lusic, M., and Siliciano, R.F. (2017). Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 69–82.
- 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.
- Ma, X., Yang, T., Luo, Y., Wu, L., Jiang, Y., Song, Z., Pan, T., Liu, B., Liu, G., Liu, J., et al. (2019). TRIM28 promotes HIV-1 latency by SUMOylating CDK9 and inhibiting P-TEFb. *ELife* **8**, e42426.
- Maldarelli, F., Wu, X., Su, L., Simonetti, F.R., Shao, W., Hill, S., Spindler, J., Ferris, A.L., Mellors, J.W., Kearney, M.F., et al. (2014). HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* **345**, 179–183.
- Mannen, H., Tseng, H.M., Cho, C.L., and Li, S.S. (1996). Cloning and expression of human homolog HSMT3 to yeast SMT3 suppressor of MIF2 mutations in a centromere protein gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**, 178–180.
- 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., Forouzanfar, F., Ait-Ammar, A., Fahmi, F., El Mekdad, H., Daouad, F., Rohr, O., and Schwartz, C. (2016). Targeting the Brain Reservoirs: Toward an HIV Cure. *Front. Immunol.* **7**, 397.

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.

Martinat, C., Cormier, A., Tobaly-Tapiero, J., Palmic, N., Casartelli, N., Mahboubi, B., Coggins, S.A., Buchrieser, J., Persaud, M., Diaz-Griffero, F., et al. (2021). SUMOylation of SAMHD1 at Lysine 595 is required for HIV-1 restriction in non-cycling cells. *Nat. Commun.* 12, 4582.

Massanella, M., Fromentin, R., and Chomont, N. (2016). Residual inflammation and viral reservoirs: alliance against an HIV cure. *Curr. Opin. HIV AIDS* 11, 234–241.

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.

Matic, I., Schimmel, J., Hendriks, I.A., van Santen, M.A., van de Rijke, F., van Dam, H., Gnad, F., Mann, M., and Vertegaal, A.C.O. (2010). Site-specific identification of SUMO-2 targets in cells reveals an inverted SUMOylation motif and a hydrophobic cluster SUMOylation motif. *Mol. Cell* 39, 641–652.

Matreyek, K.A., and Engelman, A. (2013). Viral and Cellular Requirements for the Nuclear Entry of Retroviral Preintegration Nucleoprotein Complexes. *Viruses* 5, 2483–2511.

Mattosco, D., Medda, A., and Chiocca, S. (2019). Recent Highlights: Onco Viral Exploitation of the SUMO System. *Curr. Issues Mol. Biol.* 35, 1–16.

Matunis, M.J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* 135, 1457–1470.

Maudet, C., Sourisce, A., Dragin, L., Lahouassa, H., Rain, J.-C., Bouaziz, S., Ramirez, B.C., and Margottin-Goguet, F. (2013). HIV-1 Vpr Induces the Degradation of ZIP and sZIP, Adaptors of the NuRD Chromatin Remodeling Complex, by Hijacking DCAF1/VprBP. *PLOS ONE* 8, e77320.

McArthur, J.C., Steiner, J., Sacktor, N., and Nath, A. (2010). Human immunodeficiency virus-associated neurocognitive disorders: Mind the gap. *Ann. Neurol.* 67, 699–714.

McCloskey, T.W., Ott, M., Tribble, E., Khan, S.A., Teichberg, S., Paul, M.O., Pahwa, S., Verdin, E., and Chirmule, N. (1997). Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 1014–1019.

McCutchan, J.A., Wu, J.W., Robertson, K., Koletar, S.L., Ellis, R.J., Cohn, S., Taylor, M., Woods, S., Heaton, R., Currier, J., et al. (2007). HIV suppression by HAART preserves cognitive function in advanced, immune-reconstituted AIDS patients. *AIDS Lond. Engl.* 21, 1109–1117.

McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M., and Hope, T.J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.* 159, 441–452.

McMahon, D., Jones, J., Wiegand, A., Gange, S.J., Kearney, M., Palmer, S., McNulty, S., Metcalf, J.A., Acosta, E., Rehm, C., et al. (2010). Short-Course Raltegravir Intensification Does Not Reduce Persistent Low-Level Viremia in Patients with HIV-1 Suppression during Receipt of Combination Antiretroviral Therapy. *Clin. Infect. Dis.* 50, 912–919.

Meluh, P.B., and Koshland, D. (1995). Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Mol. Biol. Cell* 6, 793–807.

Mendoza, P., Jackson, J.R., Oliveira, T., Gaebler, C., Ramos, V., Caskey, M., Jankovic, M., Nussenzweig, M.C., and Cohn, L.B. (2020). Antigen responsive CD4+ T cell clones contribute to the

HIV-1 latent reservoir. *BioRxiv* 2020.01.10.902155.

Miles, B., and Connick, E. (2016). TFH in HIV Latency and as Sources of Replication-Competent Virus. *Trends Microbiol.* 24, 338–344.

Miller, R.H. (1988). Human immunodeficiency virus may encode a novel protein on the genomic DNA plus strand. *Science* 239, 1420–1422.

Mills, E.J., Bakanda, C., Birungi, J., Chan, K., Ford, N., Cooper, C.L., Nachega, J.B., Dybul, M., and Hogg, R.S. (2011). Life expectancy of persons receiving combination antiretroviral therapy in low-income countries: a cohort analysis from Uganda. *Ann. Intern. Med.* 155, 209–216.

Miteva, M., Keusekotten, K., Hofmann, K., Praefcke, G.J.K., and Dohmen, R.J. (2010). Sumoylation as a signal for polyubiquitylation and proteasomal degradation. *Subcell. Biochem.* 54, 195–214.

Miura, K., Jin, J.B., and Hasegawa, P.M. (2007). Sumoylation, a post-translational regulatory process in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 495–502.

Mohideen, F., Capili, A.D., Bilimoria, P.M., Yamada, T., Bonni, A., and Lima, C.D. (2009). A molecular basis for phosphorylation-dependent SUMO conjugation by the E2 UBC9. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 945–952.

Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Farooq, A., Carlson, J.E., Ott, M., Verdin, E., and Zhou, M.-M. (2002). Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol. Cell* 9, 575–586.

Munir, S., Thierry, S., Subra, F., Deprez, E., and Delelis, O. (2013). Quantitative analysis of the time-course of viral DNA forms during the HIV-1 life cycle. *Retrovirology* 10, 87.

Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P.P., and Dejean, A. (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev. Cell* 9, 769–779.

Nath, A., Psooy, K., Martin, C., Knudsen, B., Magnuson, D.S., Haughey, N., and Geiger, J.D. (1996). Identification of a human immunodeficiency virus type 1 Tat epitope that is neuroexcitatory and neurotoxic. *J. Virol.* 70, 1475–1480.

Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., et al. (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev.* 20, 966–976.

Nayak, A., Glöckner-Pagel, J., Vaeth, M., Schumann, J.E., Buttmann, M., Bopp, T., Schmitt, E., Serfling, E., and Berberich-Siebelt, F. (2009). Sumoylation of the Transcription Factor NFATc1 Leads to Its Subnuclear Relocalization and Interleukin-2 Repression by Histone Deacetylase *. *J. Biol. Chem.* 284, 10935–10946.

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., Bass, I.N., 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.

Nepveu-Traversy, M.-É., and Berthoux, L. (2014). The conserved sumoylation consensus site in TRIM5α modulates its immune activation functions. *Virus Res.* 184, 30–38.

Neuveut, C., Scoggins, R.M., Camerini, D., Markham, R.B., and Jeang, K.-T. (2003). Requirement for the Second Coding Exon of Tat in the Optimal Replication of Macrophage-Tropic HIV-1. *J. Biomed. Sci.* 10, 651–660.

- Nkeze, J., Li, L., Benko, Z., Li, G., and Zhao, R. (2015). Molecular characterization of HIV-1 genome in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Biosci.*
- Novikova, M., Zhang, Y., Freed, E.O., and Peng, K. (2019). Multiple Roles of HIV-1 Capsid during the Virus Replication Cycle. *Viol. Sin.* 34, 119–134.
- Nowak, M., and Hammerschmidt, M. (2006). Ubc9 regulates mitosis and cell survival during zebrafish development. *Mol. Biol. Cell* 17, 5324–5336.
- 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.
- Otto, G. (2021). HIV-1 capsid gains nuclear entry. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 223.
- 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.
- Pan, M.-R., Chang, T.-M., Chang, H.-C., Su, J.-L., Wang, H.-W., and Hung, W.-C. (2009). Sumoylation of Prox1 controls its ability to induce VEGFR3 expression and lymphatic phenotypes in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 122, 3358–3364.
- 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.
- Panfil, A.R., London, J.A., Green, P.L., and Yoder, K.E. (2018). CRISPR/Cas9 Genome Editing to Disable the Latent HIV-1 Provirus. *Front. Microbiol.* 9, 3107.
- Pardons, M., Baxter, A.E., Massanella, M., Pagliuzza, A., Fromentin, R., Dufour, C., Leyre, L., Routy, J.-P., Kaufmann, D.E., and Chomont, N. (2019). Single-cell characterization and quantification of translation-competent viral reservoirs in treated and untreated HIV infection. *PLoS Pathog.* 15, e1007619.
- Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527–2534.
- Patnaik, A., Chau, V., and Wills, J.W. (2000). Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13069–13074.
- Peng, K., Muranyi, W., Glass, B., Laketa, V., Yant, S.R., Tsai, L., Cihlar, T., Müller, B., and Kräusslich, H.-G. (2014). Quantitative microscopy of functional HIV post-entry complexes reveals association of replication with the viral capsid. *ELife* 3, e04114.
- Perelson, A.S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., Markowitz, M., and Ho, D.D. (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 387, 188–191.
- Perkins, N.D., Felzien, L.K., Betts, J.C., Leung, K., Beach, D.H., and Nabel, G.J. (1997). Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science* 275, 523–527.
- Picard, N., Caron, V., Bilodeau, S., Sanchez, M., Mascle, X., Aubry, M., and Tremblay, A. (2012). Identification of estrogen receptor β as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3 β . *Mol. Cell. Biol.* 32, 2709–2721.

- Pichler, A., Knipscheer, P., Oberhofer, E., van Dijk, W.J., Körner, R., Olsen, J.V., Jentsch, S., Melchior, F., and Sixma, T.K. (2005). SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 264–269.
- Pichler, A., Fatouros, C., Lee, H., and Eisenhardt, N. (2017). SUMO conjugation - a mechanistic view. *Biomol. Concepts* **8**, 13–36.
- Pichon, X., Lagha, M., Mueller, F., and Bertrand, E. (2018). A Growing Toolbox to Image Gene Expression in Single Cells: Sensitive Approaches for Demanding Challenges. *Mol. Cell* **71**, 468–480.
- Postler, T.S., and Desrosiers, R.C. (2013). The Tale of the Long Tail: the Cytoplasmic Domain of HIV-1 gp41. *J. Virol.* **87**, 2–15.
- Price, A.J., Jacques, D.A., McEwan, W.A., Fletcher, A.J., Essig, S., Chin, J.W., Halambage, U.D., Aiken, C., and James, L.C. (2014). Host cofactors and pharmacologic ligands share an essential interface in HIV-1 capsid that is lost upon disassembly. *PLoS Pathog.* **10**, e1004459.
- Purvis, S.F., Jacobberger, J.W., Sramkoski, R.M., Patki, A.H., and Lederman, M.M. (1995). HIV type 1 Tat protein induces apoptosis and death in Jurkat cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**, 443–450.
- Quercioli, V., Di Primio, C., Casini, A., Mulder, L.C.F., Vranckx, L.S., Borrenberghs, D., Gijsbers, R., Debyser, Z., and Cereseto, A. (2016). Comparative Analysis of HIV-1 and Murine Leukemia Virus Three-Dimensional Nuclear Distributions. *J. Virol.* **90**, 5205–5209.
- Rao, V.R., Ruiz, A.P., and Prasad, V.R. (2014). Viral and cellular factors underlying neuropathogenesis in HIV associated neurocognitive disorders (HAND). *AIDS Res. Ther.* **11**, 13.
- 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.
- Rensen, E., Mueller, F., Scoca, V., Parmar, J.J., Souque, P., Zimmer, C., and Di Nunzio, F. (2021). Clustering and reverse transcription of HIV-1 genomes in nuclear niches of macrophages. *EMBO J.* **40**, e105247.
- Réu, P., Khosravi, A., Bernard, S., Mold, J.E., Salehpour, M., Alkass, K., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., et al. (2017). The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Rep.* **20**, 779–784.
- Richetta, C., Thierry, S., Thierry, E., Lesbats, P., Lapaillerie, D., Munir, S., Subra, F., Leh, H., Deprez, E., Parissi, V., et al. (2019). Two-long terminal repeat (LTR) DNA circles are a substrate for HIV-1 integrase. *J. Biol. Chem.* **294**, 8286–8295.
- Rodriguez, J., and Larson, D.R. (2020). Transcription in Living Cells: Molecular Mechanisms of Bursting. *Annu. Rev. Biochem.* **89**, 189–212.
- Rohr, O., Lecestre, D., Chasserot-Golaz, S., Marban, C., Avram, D., Aunis, D., Leid, M., and Schaeffer, E. (2003). Recruitment of Tat to heterochromatin protein HP1 via interaction with CTIP2 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in microglial cells. *J. Virol.* **77**, 5415–5427.
- Romani, B., Baygloo, N.S., Hamidi-Fard, M., Aghasadeghi, M.R., and Allahbakhshi, E. (2016). HIV-1 Vpr Protein Induces Proteasomal Degradation of Chromatin-associated Class I HDACs to Overcome Latent Infection of Macrophages. *J. Biol. Chem.* **291**, 2696–2711.
- Rosonina, E., Akhter, A., Dou, Y., Babu, J., and Sri Theivakadacham, V.S. (2017). Regulation of transcription factors by sumoylation. *Transcription* **8**, 220–231.
- Roy, S., Delling, U., Chen, C.H., Rosen, C.A., and Sonenberg, N. (1990). A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev.* **4**, 1365–1373.

- Ryu, H.-Y., and Hochstrasser, M. (2021). Histone sumoylation and chromatin dynamics. *Nucleic Acids Res.* **49**, 6043–6052.
- Sacktor, N., Skolasky, R.L., Seaberg, E., Munro, C., Becker, J.T., Martin, E., Ragin, A., Levine, A., and Miller, E. (2016). Prevalence of HIV-associated neurocognitive disorders in the Multicenter AIDS Cohort Study. *Neurology* **86**, 334–340.
- Sáez-Cirión, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., Potard, V., Versmisse, P., Melard, A., Prazuck, T., et al. (2013). Post-treatment HIV-1 controllers with a long-term virological remission after the interruption of early initiated antiretroviral therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog.* **9**, e1003211.
- Saitoh, H., and Hinchey, J. (2000). Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J. Biol. Chem.* **275**, 6252–6258.
- Salemi, M., Lamers, S.L., Yu, S., Oliveira, T. de, Fitch, W.M., and McGrath, M.S. (2005). Phylodynamic Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Distinct Brain Compartments Provides a Model for the Neuropathogenesis of AIDS. *J. Virol.* **79**, 11343–11352.
- Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Saragosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., et al. (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722–725.
- Sannier, G., Dubé, M., Dufour, C., Richard, C., Brassard, N., Delgado, G.-G., Pagliuzza, A., Baxter, A.E., Niessl, J., Brunet-Ratnasingham, E., et al. (2021).
- Combined single-cell transcriptional, translational, and genomic profiling reveals HIV-1 reservoir diversity. *Cell Rep.* **36**.
- Sauter, D., Hotter, D., Van Driessche, B., Stürzel, C.M., Kluge, S.F., Wildum, S., Yu, H., Baumann, B., Wirth, T., Plantier, J.-C., et al. (2015). Differential regulation of NF- κ B-mediated proviral and antiviral host gene expression by primate lentiviral Nef and Vpu proteins. *Cell Rep.* **10**, 586–599.
- Schier, A.C., and Taatjes, D.J. (2020). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes Dev.* **34**, 465–488.
- Schimmel, J., Larsen, K.M., Matic, I., van Hagen, M., Cox, J., Mann, M., Andersen, J.S., and Vertegaal, A.C.O. (2008). The ubiquitin-proteasome system is a key component of the SUMO-2/3 cycle. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **7**, 2107–2122.
- Schnell, G., Spudich, S., Harrington, P., Price, R.W., and Swanstrom, R. (2009). Compartmentalized Human Immunodeficiency Virus Type 1 Originates from Long-Lived Cells in Some Subjects with HIV-1–Associated Dementia. *PLOS Pathog.* **5**, e1000395.
- Schröder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521–529.
- Schulz, S., Chachami, G., Kozaczekiewicz, L., Winter, U., Stankovic-Valentin, N., Haas, P., Hofmann, K., Urlaub, H., Ova, H., Wittbrodt, J., et al. (2012). Ubiquitin-specific protease-like 1 (USPL1) is a SUMO isopeptidase with essential, non-catalytic functions. *EMBO Rep.* **13**, 930–938.
- Schwartz, C., Bouchat, S., Marban, C., Gautier, V., Van Lint, C., Rohr, O., and Le Douce, V. (2017). On the way to find a cure: Purging latent HIV-1 reservoirs. *Biochem. Pharmacol.*
- Scoca, V., and Di Nunzio, F. (2021). The HIV-1 Capsid: From Structural Component to Key Factor for Host Nuclear Invasion. *Viruses* **13**, 273.
- Scoca, V., Louveaux, M., Morin, R., Ershov, D., Tinevez, J.-Y., and Nunzio, F.D. (2020). Direct tracking of single proviruses reveals HIV-1/LEDGF complexes excluded from virus-induced membraneless organelles.

- Selyutina, A., Persaud, M., Lee, K., KewalRamani, V., and Diaz-Griffero, F. (2020). Nuclear Import of the HIV-1 Core Precedes Reverse Transcription and Uncoating. *Cell Rep.* 32, 108201.
- Sengupta, S., and Siliciano, R.F. (2018). Targeting the Latent Reservoir for HIV-1. *Immunity* 48, 872–895.
- Shadrina, O., Garanina, I., Korolev, S., Zatsepin, T., Van Assche, J., Daouad, F., Wallet, C., Rohr, O., and Gottikh, M. (2020). Analysis of RNA binding properties of human Ku protein reveals its interactions with 7SK snRNA and protein components of 7SK snRNP complex. *Biochimie* 171–172, 110–123.
- Sharp, P.M., Bailes, E., Chaudhuri, R.R., Rodenburg, C.M., Santiago, M.O., and Hahn, B.H. (2001). The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 356, 867–876.
- Shen, Z., Pardington-Purtymun, P.E., Comeaux, J.C., Moyzis, R.K., and Chen, D.J. (1996). UBL1, a human ubiquitin-like protein associating with human RAD51/RAD52 proteins. *Genomics* 36, 271–279.
- Sheridan, P.L., Mayall, T.P., Verdin, E., and Jones, K.A. (1997). Histone acetyltransferases regulate HIV-1 enhancer activity in vitro. *Genes Dev.* 11, 3327–3340.
- Shiio, Y., and Eisenman, R.N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *PNAS* 100, 13225–13230.
- Shin, E.J., Shin, H.M., Nam, E., Kim, W.S., Kim, J.-H., Oh, B.-H., and Yun, Y. (2012). DeSUMOylating isopeptidase: a second class of SUMO protease. *EMBO Rep.* 13, 339–346.
- Shioda, T., Levy, J.A., and Cheng-Mayer, C. (1991). Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* 349, 167–169.
- Shun, M.-C., Raghavendra, N.K., Vandegraaff, N., Daigle, J.E., Hughes, S., Kellam, P., Cherepanov, P., and Engelman, A. (2007). LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes Dev.* 21, 1767–1778.
- Sierra, S., Kupfer, B., and Kaiser, R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* 34, 233–244.
- Siliciano, R.F., and Greene, W.C. (2011). HIV latency. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a007096.
- Siliciano, J.D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J.B., Kovacs, C., Gange, S.J., and Siliciano, R.F. (2003). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat. Med.* 9, 727–728.
- Simon, V., and Ho, D.D. (2003). HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 181–190.
- Simonetti, F.R., Sobolewski, M.D., Fyne, E., Shao, W., Spindler, J., Hattori, J., Anderson, E.M., Watters, S.A., Hill, S., Wu, X., et al. (2016). Clonally expanded CD4+ T cells can produce infectious HIV-1 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 1883–1888.
- 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.
- 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.
- Smith, S.M., Pentlicky, S., Klase, Z., Singh, M., Neuveut, C., Lu, C., Reitz, M.S., Yarchoan, R., Marx, P.A., and Jeang, K.-T. (2003). An in Vivo Replication-important Function in the Second Coding Exon of Tat Is Constrained against Mutation despite Cytotoxic T Lymphocyte Selection *. *J. Biol. Chem.* 278,

44816–44825.

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.

Staudinger, J.L. (2017). The Molecular Interface Between the SUMO and Ubiquitin Systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* 963, 99–110.

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.

von Stockenstrom, S., Odevall, L., Lee, E., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., Epling, L., Shao, W., Hoh, R., Ho, T., et al. (2015). Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool During Effective HIV Therapy. *J. Infect. Dis.* 212, 596–607.

Sun, Y., Miller Jenkins, L.M., Su, Y.P., Nitiss, K.C., Nitiss, J.L., and Pommier, Y. (2020). A conserved SUMO pathway repairs topoisomerase DNA-protein cross-links by engaging ubiquitin-mediated proteasomal degradation. *Sci. Adv.* 6, eaba6290.

Sutherland, E.J., and Brew, B.J. (2018). Human Immunodeficiency Virus and the Nervous System. *Neurol. Clin.* 36, 751–765.

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.

Swift, M.L., Sell, C., and Azizkhan-Clifford, J. (2021). DNA damage-induced degradation of Sp1 promotes cellular senescence. *GeroScience*.

Swiggard, W.J., Baytop, C., Yu, J.J., Dai, J., Li, C., Schretzenmair, R., Theodosopoulos, T., and O'Doherty, U. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 can establish latent infection in resting CD4⁺ T cells in the absence of activating stimuli. *J. Virol.* 79, 14179–14188.

Tagliamonte, M., Tornesello, M.L., Buonaguro, F.M., and Buonaguro, L. (2011). Conformational HIV-1 envelope on particulate structures: a tool for chemokine coreceptor binding studies. *J. Transl. Med.* 9 *Suppl 1*, S1.

Tantale, K., Garcia-Oliver, E., Robert, M.-C., L'Hostis, A., Yang, Y., Tsanov, N., Topno, R., Gostan, T., Kozulic-Pirher, A., Basu-Shrivastava, M., et al. (2021). Stochastic pausing at latent HIV-1 promoters generates transcriptional bursting. *Nat. Commun.* 12, 4503.

Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H., and Hay, R.T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J. Biol. Chem.* 276, 35368–35374.

Tatham, M.H., Geoffroy, M.-C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E.G., Palvimo, J.J., and Hay, R.T. (2008). RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat. Cell Biol.* 10, 538–546.

Tavazzi, E., Morrison, D., Sullivan, P., Morgello, S., and Fischer, T. (2014). Brain inflammation is a common feature of HIV-infected patients without HIV encephalitis or productive brain infection. *Curr. HIV Res.* 12, 97–110.

Telwatte, S., Lee, S., Somsouk, M., Hatano, H., Baker, C., Kaiser, P., Kim, P., Chen, T.-H., Milush, J., Hunt, P.W., et al. (2018). Gut and blood differ in constitutive blocks to HIV transcription, suggesting tissue-specific differences in the mechanisms that govern HIV latency. *PLOS Pathog.* 14, e1007357.

Tempé, D., Vives, E., Brockly, F., Brooks, H., De Rossi, S., Piechaczyk, M., and Bossis, G. (2014). SUMOylation of the inducible (c-Fos:c-Jun)/AP-1 transcription complex occurs on target promoters to

limit transcriptional activation. *Oncogene* 33, 921–927.

Terui, Y., Saad, N., Jia, S., McKeon, F., and Yuan, J. (2004). Dual role of sumoylation in the nuclear localization and transcriptional activation of NFAT1. *J. Biol. Chem.* 279, 28257–28265.

Thierry, S., Munir, S., Thierry, E., Subra, F., Leh, H., Zamborlini, A., Saenz, D., Levy, D.N., Lesbats, P., Saïb, A., et al. (2015). Integrase inhibitor reversal dynamics indicate unintegrated HIV-1 dna initiate de novo integration. *Retrovirology* 12, 24.

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.* 109, 21122–21127.

Ullmann, R., Chien, C.D., Avantaggiati, M.L., and Muller, S. (2012). An acetylation switch regulates SUMO-dependent protein interaction networks. *Mol. Cell* 46, 759–770.

Van Heuverswyn, F., Li, Y., Bailes, E., Neel, C., Lafay, B., Keele, B.F., Shaw, K.S., Takehisa, J., Kraus, M.H., Loul, S., et al. (2007). Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon. *Virology* 368, 155–171.

Van Lint, C., Emiliani, S., Ott, M., and Verdin, E. (1996). Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J.* 15, 1112–1120.

Van Lint, C., Amella, C.A., Emiliani, S., John, M., Jie, T., and Verdin, E. (1997). Transcription factor binding sites downstream of the human immunodeficiency virus type 1 transcription start site are important for virus infectivity. *J. Virol.* 71, 6113–6127.

Van Lint, C., Bouchat, S., and Marcello, A. (2013). HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* 10, 67.

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.

Van Rechem, C., 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.

Varejão, N., Lascorz, J., Li, Y., and Reverter, D. (2020). Molecular mechanisms in SUMO conjugation. *Biochem. Soc. Trans.* 48, 123–135.

Veenhuis, R.T., Abreu, C.M., Shirk, E.N., Gama, L., and Clements, J.E. (2021). HIV replication and latency in monocytes and macrophages. *Semin. Immunol.* 101472.

Venkataramana, A., Pardo, C.A., McArthur, J.C., Kerr, D.A., Irani, D.N., Griffin, J.W., Burger, P., Reich, D.S., Calabresi, P.A., and Nath, A. (2006). Immune reconstitution inflammatory syndrome in the CNS of HIV-infected patients. *Neurology* 67, 383–388.

Vera, J.H., Guo, Q., Cole, J.H., Boasso, A., Greathead, L., Kelleher, P., Rabiner, E.A., Kalk, N., Bishop, C., Gunn, R.N., et al. (2016). Neuroinflammation in treated HIV-positive individuals: A TSPO PET study. *Neurology* 86, 1425–1432.

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.

Vos, S.M., Farnung, L., Urlaub, H., and Cramer, P. (2018a). Structure of paused transcription complex Pol II-DSIF-NELF. *Nature* 560, 601–606.

Vos, S.M., Farnung, L., Boehning, M., Wigge, C., Linden, A., Urlaub, H., and Cramer, P. (2018b). Structure of activated transcription complex Pol II-DSIF-PAF-SPT6. *Nature* 560, 607–612.

Vyas, R., Kumar, R., Clermont, F., Helfricht, A., Kalev, P., Sotiropoulou, P., Hendriks, I.A., Radaelli, E., Hocheppied, T., Blanpain, C., et al. (2013). RNF4 is required for DNA double-strand break repair in vivo. *Cell Death Differ.* 20, 490–502.

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

Wallet, C., De Rovere, M., Van Assche, J., Daouad, F., De Wit, S., Gautier, V., Mallon, P.W.G., Marcello, A., Van Lint, C., Rohr, O., et al. (2019). Microglial Cells: The Main HIV-1 Reservoir in the Brain. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9.

Wallet, C., Rohr, O., and Schwartz, C. (2020). Evolution of a concept: From accessory protein to key virulence factor, the case of HIV-1 Vpr. *Biochem. Pharmacol.* 180, 114128.

Wang, C.-Y., Podolsky, R., and She, J.-X. (2006). Genetic and functional evidence supporting SUMO4 as a type 1 diabetes susceptibility gene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1079, 257–267.

Wang, G., Zhao, N., Berkhout, B., and Das, A.T. (2018). CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Res.* 244, 321–332.

Wang, J., Yang, Z., Wu, N.-P., and Yang, J. (2020). Increased expression of BCL11B and its recruited chromatin remodeling factors during highly active antiretroviral therapy synergistically represses the transcription of human immunodeficiency virus type 1 and is associated with residual immune activation. *Arch. Virol.* 165, 321–330.

Wang, L., Wansleben, C., Zhao, S., Miao, P., Paschen, W., and Yang, W. (2014). SUMO2 is essential while SUMO3 is dispensable for mouse embryonic development. *EMBO Rep.* 15, 878–885.

Wang, M., Sang, J., Ren, Y., Liu, K., Liu, X., Zhang, J., Wang, H., Wang, J., Orian, A., Yang, J., et al. (2016). SENP3 regulates the global protein turnover and the Sp1 level via antagonizing SUMO2/3-targeted ubiquitination and degradation. *Protein Cell* 7, 63–77.

Watters, S.A., Mlcochova, P., and Gupta, R.K. (2013). Macrophages: the neglected barrier to eradication. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 26, 561–566.

Weber, S., Weiser, B., Kemal, K.S., Burger, H., Ramirez, C.M., Korn, K., Anastos, K., Kaul, R., Kovacs, C., and Doerfler, W. (2014). Epigenetic analysis of HIV-1 proviral genomes from infected individuals: predominance of unmethylated CpG's. *Virology* 449, 181–189.

Weeks, K.M., and Crothers, D.M. (1991). RNA recognition by Tat-derived peptides: interaction in the major groove? *Cell* 66, 577–588.

Wei, W., Yang, P., Pang, J., Zhang, S., Wang, Y., Wang, M.-H., Dong, Z., She, J.-X., and Wang, C.-Y. (2008). A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 454–459.

Whitney, J.B., Hill, A.L., Sanisetty, S., Penaloza-MacMaster, P., Liu, J., Shetty, M., Parenteau, L., Cabral, C., Shields, J., Blackmore, S., et al. (2014). Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature* 512, 74–77.

Wilen, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012). Molecular Mechanisms of HIV Entry. In *Viral Molecular Machines*, M.G. Rossmann, and V.B. Rao, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 223–242.

Wong, J.K., Hezareh, M., Günthard, H.F., Havlir, D.V., Ignacio, C.C., Spina, C.A., and Richman, D.D. (1997). Recovery of Replication-Competent HIV Despite Prolonged Suppression of Plasma Viremia. *Science* 278, 1291–1295.

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.

Yang, S.-H., and Sharrocks, A.D. (2004). SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell* **13**, 611–617.

Yang, S.-H., Galanis, A., Witty, J., and Sharrocks, A.D. (2006). An extended consensus motif enhances the specificity of substrate modification by SUMO. *EMBO J.* **25**, 5083–5093.

Yukl, S.A., Kaiser, P., Kim, P., Telwatte, S., Joshi, S.K., Vu, M., Lampiris, H., and Wong, J.K. (2018). HIV latency in isolated patient CD4⁺ T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaap9927.

Zenzie-Gregory, B., Sheridan, P., Jones, K.A., and Smale, S.T. (1993). HIV-1 core promoter lacks a simple initiator element but contains a bipartite activator at the transcription start site. *J. Biol. Chem.* **268**, 15823–15832.

Zhang, J., Yuan, C., Wu, J., Elsayed, Z., and Fu, Z. (2015). Polo-like Kinase 1-mediated Phosphorylation of Forkhead Box Protein M1b Antagonizes Its SUMOylation and Facilitates Its Mitotic Function *. *J. Biol. Chem.* **290**, 3708–3719.

Zhang, L., Vogel, W.K., Liu, X., Topark-Ngarm, A., Arbogast, B.L., Maier, C.S., Filtz, T.M., and Leid, M. (2012a). 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., Bhattacharya, S., Leid, M., Ganguli-Indra, G., and Indra, A.K. (2012b). Ctip2 is a dynamic regulator of epidermal proliferation and differentiation by integrating EGFR and Notch signaling. *J. Cell Sci.* **125**, 5733–5744.

Zhao, L., Wang, S., Xu, M., He, Y., Zhang, X., Xiong, Y., Sun, H., Ding, H., Geng, W., Shang, H., et al. (2021). Vpr counteracts the restriction of LAPT5 to promote HIV-1 infection in macrophages. *Nat. Commun.* **12**, 3691.

Zila, V., Margiotta, E., Turoňová, B., Müller, T.G., Zimmerli, C.E., Mattei, S., Allegretti, M., Börner, K., Rada, J., Müller, B., et al. (2021). Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores. *Cell* **184**, 1032–1046.e18.

Annexes

Annexe 1 : Protocole SARS-CoV-2

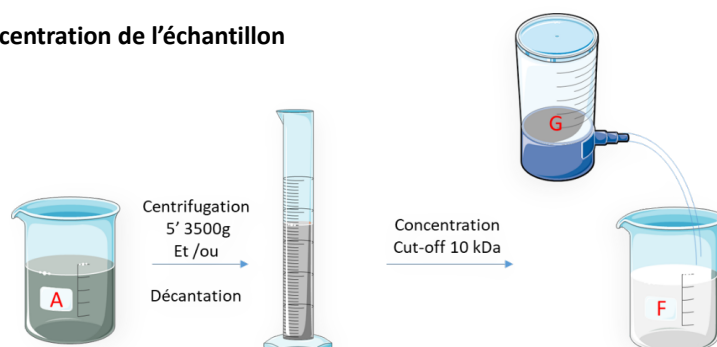
Protocole construit et validé par notre laboratoire pour la détection du SARS-CoV-2 dans les eaux usées, dans le cadre du projet Obépine.

Protocole d'étude de la présence du SARS-CoV-2 dans les eaux usées

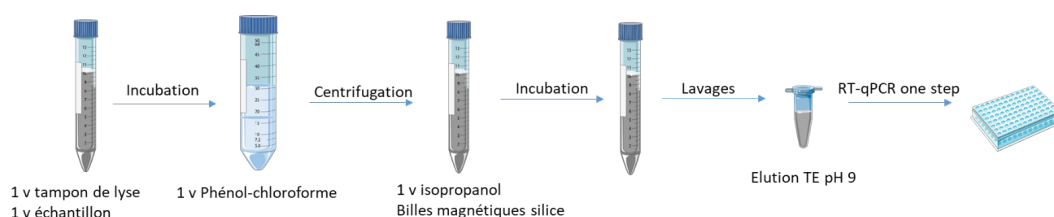
Laboratoire UR7292, IUT Louis Pasteur, Université de Strasbourg

I. Protocole expérimental

Étape 1 : Concentration de l'échantillon



Étape 2 : Extraction de l'ARN viral et analyse



L'étape 1 de ce protocole n'est réalisée que lorsque le virus n'est plus détectable dans 5mL avec le protocole de l'étape 2.

Toujours bien **annoter ses tubes**

Veillez à respecter les règles de sécurité ci-dessus afin de ne pas vous contaminer et contaminer votre environnement de travail. Porter une blouse, des gants et des lunettes de sécurité pour toutes les étapes.

Rester dans l'espace Covid durant toute la manipulation, ne pas utiliser ou toucher du matériel du laboratoire VIH avec ses gants Covid.

Limitier au maximum l'échange de matériel. Faire la vaisselle dans l'évier de la paillasse Covid.

Au cours de l'expérience, décontaminer dès la fin de l'utilisation le matériel/verrerie/solution avec du Virkon et laisser incuber le temps de la manipulation (minimum 10min d'incubation)

Tous les déchets Covid doivent impérativement être jetés dans les poubelles rouges prévues à cet effet. Lorsqu'elles sont pleines, changer de gants, fermer la poubelle hermétiquement et l'autoclaver le plus rapidement possible. Remplacer par un sac rouge neuf.

A. Prétraitement des échantillons

Avant de débuter la manipulation :

Chercher de la glace
Préparer une fiche de suivi pour chaque eau analysée
Remplir la fiche de suivi avec le volume d'eau analysé

Annoter un tube falcon 15 avec la lettre **A** et prélever 1 aliquot de 5mL d'échantillon, le conserver dans la glace

B. Inactivation virale et extraction des ARN

Allumer le bain marie régler à 60°C ainsi que le thermobloc à 95°C

1. Préparation des tampons de lyse et de lavage :

Tampon de lyse :

Attention le **thiocyanate de guanidinium** est très toxique, il faut le manipuler sous hotte chimique avec des gants et un masque FFP1.

Dissoudre 144g de GuSCN dans 100mL de Tris-HCl 0,1 M pH 6,4 + 2% SDS.

Agiter la solution et chauffer à 60°C

Ajouter 9mL d'EDTA 0,5M

Ajuster le pH du tampon à pH4

Tampon de lavage 1 :

50% de tampon de lyse + 2% DTT

50% d'éthanol

Tampon de lavage 2 :

80% d'éthanol

20% d'eau DEPC

2. Ajouter extemporanément 2% de DTT (Stock 20% ; soit 1/10 du volume du tampon de lyse) dans le tampon de lyse à l'aide de cônes à filtre.

3. Préparation du phénol-chloroforme :

Attention le phénol et le chloroforme doivent toujours être utilisés sous la hotte, avec des gants et des lunettes. Il faut limiter l'utilisation de gros volumes sous la hotte. Il est impératif de bien nettoyer l'espace de travail après chaque manipulation.

Préparer le mélange phénol-chloroforme (si il n'y a pas de mélange commercial) : mélanger 25 vol de phénol (de préférence pH 4,5)/ 24 vol de chloroforme et 1 vol d'alcool isoamyl pour stabiliser. Préparer l'équivalent des besoins pour la semaine (10 mL par condition) et s'assurer que le pH de la solution de phénol chloroforme soit bien à 4 (à l'aide de papier pH).

4. Préparation des tubes à graisse :

Préparer les tubes à graisse : Mélanger la graisse silicone avec la silice (SiO_2) en proportions de 90g/10g dans un bécher (permet de voir si mélange homogène). Mettre un portoir avec des tubes de 50 mL à fond conique sur la balance et répartir 6 g de graisse silicone par tube. Centrifuger : 4 000 g / 2 min. Conserver les tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Préparation du phénol/chloroforme :

Si une préparation commerciale de phénol :chlo équilibrée n'est pas utilisée, mélanger le phénol et le chloroforme 1 :1 (v/v) dans une bouteille en verre opaque.

Si vous utilisez du phénol liquéfié non équilibré, il faut le saturer avec de l'eau distillée en mélangeant à volume égal le phénol et l'eau dans une bouteille en verre opaque. Après 24h minimum, la phase inférieure correspond au phénol saturé prêt à l'emploi. Le pH du phénol saturé doit être acide (autour de 4-5). Il est prêt à l'emploi pour le mélange phénol-chlo.

5. Dans un tube falcon de 50 mL correctement annoté ajouter :

Pour **les échantillons A** : 5mL d'échantillon

4.5mL de tampon de lyse (utiliser le pipetboy bleu à partir de cette étape).

Intégrer un contrôle d'extraction Eau ultrapure (5 mL), à traiter de la même façon que les échantillons d'eau usée.

6. **Mélanger** par retournement

7. Incuber 10 minutes à RT les échantillons pour lyser l'échantillon

8. **Incuber** à nouveau les échantillons, 10 minutes à 60°C dans le bain-marie

9. **Extraction au phénol-chloroforme.**

- Ajouter 9.5 mL de phénol-chloroforme aux échantillons. Veillez à mélanger énergiquement la bouteille de phénol chloroforme avant prélèvement et entre chaque échantillon.
- Agiter vigoureusement pendant 30 secondes (bien fermer le tube et vortexer sous la hotte. Attention à ne pas faire de projections).
- Transférer les 19 mL de mélange échantillon/tampon de lyse dans le tube à graisse préalablement annoté.
- Centrifuger les tubes pendant 5 minutes à 3500 g, la graisse vient se placer entre la phase aqueuse et le phénol-chlo
- Récupérer la phase aqueuse en pipetant (pas de retournement). Maintenir le tube le plus droit possible pour éviter un transfert de la phase organique vers la phase aqueuse.
- Jeter la graisse et le phénol chloroforme dans le bidon prévu à cet effet.
- Garder les déchets solides sous la hotte puis à la fin de l'extraction, les transférer dans une poubelle qui doit immédiatement être fermée et sortie.

10. Vérifier le pH de la phase aqueuse en déposant une goutte sur papier pH. Le pH doit être aux environs de pH4 pour que les ARN se fixent aux billes. Si ce n'est pas le cas (pH 8-9) ajouter 20 µL d'HCl pur.

11. Ajouter 15 uL d'ARN PolyA à l'aide de cône à filtre.

12. Ajouter 5 mL d'isopropanol dans chaque tube et mélanger lentement par retournement des tubes.

13. Vortexer les billes magnétiques pendant 10 secondes.

14. Dans chaque falcon, **ajouter 8 uL de billes** par falcon à l'aide de cône à filtre (! S'assurer que les billes soient en suspension : vortexer les billes avant chaque prélèvement) et homogénéiser l'échantillon par retournement

15. Incuber les échantillons, 10 minutes sous agitation manuelle par retournement

16. Transférer les tubes falcon sur un portoir magnétique et laisser les billes entièrement sédimenter. L'e surnageant doit apparaître transparent et translucide, et les billes bien visibles sur la paroi du tube côté aimant.

17. S'assurer que toutes les billes aient été fixées. Pour ce faire, retourner le tube fermé afin de bien récupérer toutes les billes (notamment dans le capuchon et sur les parois) puis verser le surnageant par retournement du falcon sans perturber le culot de billes.

18. Ajouter 1mL de tampon de lavage 1 le long de la paroi du tube pour faire glisser les billes et récupérer toutes les billes (sur les parois également) puis transférer les billes et le tampon de lavage dans des tubes eppendorf 1,5mL **préalablement correctement annotés** (couvercle et paroi du tube). Ne pas pipeter/refouler.

19. Transférer les tubes sur un portoir magnétique et laisser les billes entièrement sédimenter. Essuyer l'embout de la pipette P1000 avec du papier entre chaque échantillon.

20. Aspirer le surnageant sans que le culot de billes ne soit touché puis laver les billes à nouveau avec 1mL de tampon de lavage 1. Retirer le magnet du portoir afin de resuspendre les billes. Remettre le magnet, laisser les billes sédimenter.

21. Retirer le surnageant. Retirer le magnet du portoir et ajouter 1mL de tampon de lavage 2, retirer à nouveau le magnet et mélanger énergiquement par retournement afin de resuspendre les billes.

22. Remettre le magnet sur le portoir et aspirer le surnageant

23. Retirer le magnet du portoir et ajouter 300uL de tampon de lavage 2, retirer le magnet et mélanger énergiquement par retournement pour resuspendre les billes.

24. Remettre le magnet et aspirer tout le surnageant des tubes, retirer le maximum de liquide et gouttes possible à l'aide d'un cône fin

25. Laisser les tubes ouverts sur un portoir traditionnel (non aimanté) pendant 5 minutes à RT pour que les résidus d'éthanol s'évaporent. (Ne pas chauffer et ne pas laisser les billes trop sécher)

Nettoyer sa paillasse avec du RNase away ainsi que ses pipettes.

26. Ajouter 50uL de TE pH9 aux billes avec un cône à filtre sur le culot de billes

27. Vortexer le tube afin de détacher les billes du tube et les remettre en suspension. Si il reste des billes fixées au tube, frotter délicatement la paroi avec un cône. Le mélange billes-tampon d'élution doit être homogène.

28. Transférer les tubes dans le thermobloc et incuber pendant 10 minutes à 95°C.

29. Pendant ce temps, ajouter 150 uL de prep buffer dans les puits de la plaque Zymo et la disposer sur la plaque « Elution 1 ». Patienter au moins 5 minutes.

30. Centrifuger les tubes avec la centrifugeuse de paillasse. Puis placer les tubes sur un portoir magnétique.

31. Centrifuger la plaque Zymo pendant 5 min à 3500g, retirer le volume passé dans les colonnes et ajouter 50 uL de TE dans les puits de la plaque Zymo.

32. Centrifuger à nouveau pendant 5 min à 3500 g.

33. Retirer le volume passé à travers les colonnes et refaire une centrifugation à sec pendant 1 min à 3500 g.

34. Disposer la plaque Zymo sur la plaque « Elution ARN » et ajouter 50 uL d'ARN élué dans la plaque et centrifuger pendant 5 min à 3500g.

35. Récupérer les ARN élués et transférer dans des racks de microtubes PCR préalablement et correctement annotés (RNase Free).

Conserver l'échantillon dans la glace si la PCR est effectuée directement et sinon, conserver les échantillons à -80°C dans un contenant clairement identifié.

L'étape d'extraction des ARN est terminée.

Retirer sa deuxième paire de gants et la remplacer par une paire propre. Nettoyer toute la paillasse ainsi que les différents outils au Virkon. Après décontamination au Virkon, faire la vaisselle en nettoyant au liquide vaisselle et rincer la verrerie ainsi que le plastique à l'eau distillée avant de mettre à sécher.

Retirer ses EPI (lunettes, masques, et blouse) puis ses gants et se laver les mains (savon + SHL).

C. RT-qPCR

1. Informations générales

Chaque étape du protocole doit être réalisée dans de la glace (dans un bac préalablement décontaminé au RNase Away™ et DNase Away™ (Fisher Scientific)). Il est important d'utiliser des cônes à filtres anti-aérosols et des pipettes dédiées à cet effet. La préparation des mix doit impérativement être effectuée sous la hotte réservée exclusivement à cet effet.

L'appareil utilisé est le CFX Connect de Biorad.

La RT-qPCR en une étape est réalisée à l'aide du kit TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix de Applied biosystems.

1. Analyse des échantillons par PCR

Sous la hotte de PCR, procéder à la préparation du mix. Attention, on ajoute 3 puits en plus lors du calcul pour la marge d'erreur de pipetage.

- Avant de débiter la préparation des échantillons s'assurer que tout le matériel est sous la hotte, déposer la glace et les pipettes puis allumer les UV pendant 20 minutes
- Puis sortir du -20°C tous les réactifs nécessaires et les disposer dans la glace
- Préparer les dilutions d'amorces, ainsi que les dilutions de probe.

Réalisation des mix : quantité de réactif par puits de PCR :

Pour les puits dengue et phage GII on dépose **2,5 µL d'ARN et donc 7,5 µL de mix** dans chaque puits

Pour les puits ENV et IP4 on dépose **5µL d'ARN et 5 µL de mix** dans chaque puits

Mix Dengue ARN+	pour 1 puit
Master Mix	2,5
Primers F+R	1,6
Probe	0,2
H2O	0,7
ARN dengue 1/100	2,5
ARN à tester	2,5
Total	10

Mix Bacteriophage	pour 1 puit
Master Mix	2,5
Primers F+R	1,6
Probe	0,2
H2O	3,2
ARN à tester	2,5
Total	10

Mix Env et IP4	pour 1 puit
Master Mix	2,5
Primers F+R	1,6
Probe	0,2
H2O	0,7
ARN à tester	5
Total	10

On dépose les ARN extraits, ainsi que l'ARN de dengue hors de la hotte.

-Réaliser un mix suffisant pour le nombre de conditions (+ contrôle H2O + contrôle positif (plasmide à 1.10^E3 pour ENV et IP4, puis la marge) en **duplicat (X2)**

-**Pour le mix Dengue** : on mélange tous les composants sauf l'ARN de dengue (et l'ARN de l'échantillon). On ajoutera l'ARN de dengue au mix après être sorti de la hotte. On répartit le mix hors de la hotte.

-**Pour tous les mix**, bien homogénéiser en vortexant brièvement avant de déposer, et centrifuger rapidement avec la centrifugeuse de paillasse.

-**Déposer tous les mix** dans chaque puits sous la hotte de PCR à la pipette distributrice sauf pour la dengue, où l'on sort de la hotte pour ajouter la quantité d'ARN de dengue au mix global avant de le répartir hors de la hotte.

- Ajouter **2,5 uL d'ARN pour GII et Dengue ou 5µL d'ARN pour ENV et IP4** à l'aide de la pipette multicanaux (utiliser des cones à filtre) ou d'une pipette 10 uL réservée à cet usage.

- Ne pas homogénéiser les mixs en faisant des allers-retours avec la pipette !

- Sceller hermétiquement la plaque

-Centrifuger la plaque dans l'essoreuse à salade, s'assurer que toutes les gouttes sont descendues.

- Lisser pour éviter les bulles d'air

- Sélectionner le programme TaqMan™ Fast Virus Covid dans l'appareil CFX Connect (Biorad ©) :

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Transcription inverse	50°C	5 min	x 1
Inactivation RT / denaturation initiale	95°C	20 sec	x 1
Dénaturation	95°C	3 sec	x 49
Hybridation / Elongation	58°C	30 sec	

- Sélectionner le fluorophore FAM avec le programme FAM only Covid

- Lancer la PCR

- Bien annoter le plan de plaque

- Enregistrer le fichier de PCR dans le dossier Covid et faire un nouveau dossier pour chaque semaine. Nommer le dossier sous la forme : **année-mois-W n°semaine (ex : 2021-01-W1)**

Nommer le fichier PCR de la même façon

La réaction est considérée positive si le signal sort avant 40 cycles.

- Compléter le document Excel avec vos résultats

Références :

Le protocole de purification et de concentration nous a été fourni par Pr Dominique Trebouet, IPHC, Université de Strasbourg, France.

Le protocole initial d'extraction des ARN nous a été fourni par Dr Virginie Gautier, Laboratoire CEPHR, UCD, Dublin, Irlande.

Le protocole de RT-qPCR pour le Sars-Cov-2 est issu du protocole « Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2 » de l'Institut Pasteur, Paris, France et de l'article, Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage, G. Medema et al., 2020 doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>.

Le protocole initial de RT-qPCR pour les bactériophages à ARN-F spécifique est issu de l'article Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater, Leslie Ogorzaly, Christophe Gantzer, 2006.

Le protocole a été rédigé et mis en forme par Fadoua Daouad et Jeanne Van Assche, Laboratoire DHPI, UR7292, Université de Strasbourg, France.

Annexe 2 : Publication SARS-CoV-2

Publication 5 :

Resveratrol Inhibits HCoV-229E and SARS-CoV-2 Coronavirus Replication In Vitro

Sébastien Pasquereau, Zeina Nehme, Sandy Haidar Ahmad, Fadoua Daouad, Jeanne Van Assche, Clémentine Wallet, Christian Schwartz, Olivier Rohr, Stéphanie Morot-Bizot and Georges Herbein

Viruses. 2021 Feb 23;13(2):354.

Fin 2019, un nouveau coronavirus a émergé en Chine. Ce virus appelé SARS-CoV-2 pour « severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 » s'est rapidement propagé au reste du monde. Début 2020, l'OMS a déclaré l'état de pandémie. Une des priorités a alors été de mettre au point un traitement efficace pour limiter les formes graves de la maladie, l'affluence de patients en service de réanimation et le nombre de morts. L'une des stratégies appliquées lors de l'émergence d'une nouvelle maladie est de tester l'efficacité de molécules déjà approuvées pour d'autres maladies. Dans cette étude, sept médicaments ont été testés pour leur capacité à réduire la réplication virale du coronavirus humain (HCoV)-229E. Cependant, en raison d'une cytotoxicité trop importante, seules trois molécules ont été retenues pour la suite de l'étude. Il a été observé une réduction du titre viral de 80 % avec le resveratrol (concentration efficace 50 % (EC50) = 4,6 uM) et le lopinavir/ritonavir (EC50 = 8,8 uM) et de 60 % avec la chloroquine (EC50 = 5 uM). Finalement, le resveratrol est le seul à avoir réduit le titre viral du SARS-CoV-2 avec une cytotoxicité acceptable.

Dans cette publication, j'ai contribué à la production de résultats expérimentaux. Pour ces expériences, j'ai utilisé le protocole que nous avons mis en place au laboratoire dans le cadre du projet sur le SARS-CoV-2, auquel j'ai activement participé dès son initiation en mars 2020.

Article

Resveratrol Inhibits HCoV-229E and SARS-CoV-2 Coronavirus Replication In Vitro

Sébastien Pasquereau ¹, Zeina Nehme ^{1,2}, Sandy Haidar Ahmad ^{1,2}, Fadoua Daouad ³, Jeanne Van Assche ³, Clémentine Wallet ³, Christian Schwartz ³, Olivier Rohr ³, Stéphanie Morot-Bizot ⁴ and Georges Herbein ^{1,5,*}

¹ Pathogens & Inflammation/EPILAB Laboratory, EA 4266, Université de Franche-Comté, Université Bourgogne Franche-Comté (UBFC), 25030 Besançon, France; sebastien.pasquereau@univ-fcomte.fr (S.P.); zeina.nehme@univ-fcomte.fr (Z.N.); sandyhaydar@outlook.com (S.H.A.)

² Lebanese University, P.O. Box 6573/14 Badaro Museum, Beirut, Lebanon

³ FMTS, EA7292, Université de Strasbourg, IUT Louis Pasteur, 67300 Schiltigheim, France; f.daouad@unistra.fr (F.D.); jvanassche@unistra.fr (J.V.A.); clementine.wallet@unistra.fr (C.W.); schwartz.christian@unistra.fr (C.S.); olivier.rohr@unistra.fr (O.R.)

⁴ Apex Biosolutions, 25000 Besançon, France; smorot@apexlabo.com

⁵ Department of Virology, Besancon University Hospital, 25030 Besançon, France

* Correspondence: georges.herbein@univ-fcomte.fr

Abstract: A novel coronavirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), emerged in China at the end of 2019 causing a large global outbreak. As treatments are of the utmost importance, drug repurposing embodies a rich and rapid drug discovery landscape, where candidate drug compounds could be identified and optimized. To this end, we tested seven compounds for their ability to reduce replication of human coronavirus (HCoV)-229E, another member of the coronavirus family. Among these seven drugs tested, four of them, namely rapamycin, disulfiram, loperamide and valproic acid, were highly cytotoxic and did not warrant further testing. In contrast, we observed a reduction of the viral titer by 80% with resveratrol (50% effective concentration (EC₅₀) = 4.6 μM) and lopinavir/ritonavir (EC₅₀ = 8.8 μM) and by 60% with chloroquine (EC₅₀ = 5 μM) with very limited cytotoxicity. Among these three drugs, resveratrol was less cytotoxic (cytotoxic concentration 50 (CC₅₀) = 210 μM) than lopinavir/ritonavir (CC₅₀ = 102 μM) and chloroquine (CC₅₀ = 67 μM). Thus, among the seven drugs tested against HCoV-229E, resveratrol demonstrated the optimal antiviral response with low cytotoxicity with a selectivity index (SI) of 45.65. Similarly, among the three drugs with an anti-HCoV-229E activity, namely lopinavir/ritonavir, chloroquine and resveratrol, only the latter showed a reduction of the viral titer on SARS-CoV-2 with reduced cytotoxicity. This opens the door to further evaluation to fight Covid-19.

Keywords: SARS-CoV-2; HCoV-229E; resveratrol; coronavirus; viral inhibition



Citation: Pasquereau, S.; Nehme, Z.; Haidar Ahmad, S.; Daouad, F.; Van Assche, J.; Wallet, C.; Schwartz, C.; Rohr, O.; Morot-Bizot, S.; Herbein, G. Resveratrol Inhibits HCoV-229E and SARS-CoV-2 Coronavirus Replication In Vitro. *Viruses* **2021**, *13*, 354. <https://doi.org/10.3390/v13020354>

Academic Editor: Graciela Andrei

Received: 21 January 2021

Accepted: 17 February 2021

Published: 23 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Renowned as rapidly evolving viruses, human coronaviruses (HCoVs) are positive-stranded RNA pathogens that encompass seven different strains divided into two genera: alphacoronavirus (alphaCoV) and betacoronavirus (betaCoV) [1]. Whilst alphaCoV includes the lowly pathogenic HCoV-229E and HCoV-NL63, betaCoV ramifies into the more pathogenic HCoV-OC43 and HCoV-HKU1 of the A lineage and the highly pathogenic severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), SARS-CoV-2 and the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) of the B and C lineage, respectively [2,3]. HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 and HCoV-HKU1 are endemic in human populations, accounting for 15–30% of mild, self-limiting respiratory upper infections, with a greater incidence of lower respiratory tract infection in immunocompromised individuals [4]. Both SARS-CoV, emerging in 2002 with a mortality rate of 9.6%, and MERS-CoV, responsible for the 2012 outbreak with a death rate of 35.5%, are linked to acute

respiratory distress syndrome (ARDS) potentially engendering a chronic reduction in lung function, arrhythmia or death [5]. Emerging in December 2019 from the city of Wuhan in China, SARS-CoV-2, the etiological agent behind coronavirus disease 2019 (Covid-19), is considered the cause of a major public health emergency after its large global outbreak [6]. Although causing milder symptoms compared with SARS-CoV and MERS-CoV, SARS-CoV-2 can result in severe symptoms with multiple organ complications and hyperinflammation, leading ultimately to death in some individuals [7].

Despite the fact that SARS-CoV-2 vaccines have been quickly developed [8], no definitive therapy has been shown to be effective to date against SARS-CoV-2 and therefore new treatments are actively needed [9]. Despite tremendous efforts to develop new drugs, it is well-known that this process might take years to be clinically approved and reach the market [10]. In this context, repurposing of existing drugs appears to be an effective drug discovery platform that is superior in terms of cost and time compared with de novo drug discovery, as rapid assessment of in vitro and in vivo efficacy is conceivable [11]. This is reinforced by the fact that agents previously shown to inhibit the in vitro replication of other members of the coronavirus family, for instance HCoV-229E, could be potential candidates to inhibit the replication of betacoronaviruses such as SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 [12].

In the light of what has been mentioned previously, we screened seven drugs already approved for other pathologies against the alphacoronavirus HCoV-229E. On the assumption that an inhibitory effect against HCoV-229E by one of these drugs will be found, results will be extrapolated and assessed in the context of SARS-CoV-2-infected cell cultures.

Among the seven compounds tested, valproic acid (VPA), disulfiram, rapamycin and loperamide have been previously shown to target coronavirus infection [13]. Briefly, VPA is a branched short-chain fatty acid commonly used in the management of neurological disorders [14]. This histone deacetylase inhibitor was projected as a potential candidate for drug repositioning as the viral SARS-CoV-2 protein NSP5 was found to interact with HDAC2 [15]. Disulfiram, an approved alcohol-aversive drug, was shown to inhibit the papain-like proteases of both MERS-CoV and SARS-CoV [16]. The mTOR inhibitor rapamycin, a drug used as an immunosuppressant in transplant patients, was reported to reduce MERS-CoV infection by over 60% in vitro [17] by suppressing viral protein expression and virion release [18]. Alternatively, the antidiarrheal opioid receptor agonist loperamide showed potential antiviral activity against SARS-CoV-2 [11], as well as MERS-CoV, SARS-CoV and HCoV-229E, although the exact mechanism of action is unknown [19].

Being an aspartate protease inhibitor, lopinavir is an extensively studied antiviral drug used in the management of human immunodeficiency virus (HIV) infection in combination with ritonavir, the latter boosting the effects of lopinavir through potent cytochrome P450 3A4 inhibition [20]. Lopinavir was shown to be an inhibitor of broad-spectrum coronaviruses by blocking the replication of HCoV-229E, SARS-CoV and MERS-CoV with a mean 50% effective concentration (EC₅₀) ranging from 6.6 to 17.1 μ M, in contrast to ritonavir, which showed no selective anti-CoV activity [19]. SARS-CoV patients treated with a combination of lopinavir/ritonavir and ribavirin experienced less ARDS with a lower death rate compared with historical controls who received ribavirin and corticosteroids [21]. Randomized controlled trials were conducted to assess the efficacy of lopinavir/ritonavir with or without ribavirin in SARS-CoV-2 patients [22,23].

Used originally as treatment for or prevention of malaria, the 4-aminoquinoline drug chloroquine has been repurposed and successfully employed to target some immunological and rheumatological diseases, for instance systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis [24]. In the setting of viral infections, multiple mechanisms underlie the effectiveness of chloroquine, prominently chloroquine-mediated alkalinization of phagolysosomes and/or viral entry and protein glycosylation inhibition [25]. Potential therapeutic benefits of chloroquine have been demonstrated in coronavirus infections including HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV and SARS-CoV-2 [26]. Indeed, chloroquine inhibits HCoV-229E

replication in Huh7 cells with an EC₅₀ of 3.3 μ M [19]. Moreover, pre and post treatment of Vero E6 cultures with chloroquine demonstrated antiviral activity against SARS-CoV-2 with an EC₅₀ and EC₉₀ of 1.13 μ M and 6.90 μ M, respectively [27]. In vivo, chloroquine administration was shown to inhibit SARS-CoV-2-related pneumonia, promote a virus negative conversion and reduce the disease course [28]. Based on these encouraging results, more than twenty in vivo clinical trials are in progress to evaluate chloroquine's effectiveness against SARS-CoV-2 [29]. Nevertheless, the efficiency of chloroquine against Covid-19 remains highly controversial [30].

Belonging to the polyphenols stilbenoids group, resveratrol is a well-known nutraceutical with a multitude of biological properties and therapeutic applications [31]. Among the latter, resveratrol exhibits an anti-tumor activity that has been confirmed in in vitro and in vivo studies, where resveratrol modulates a divergent set of transcription factors, upstream kinases and intracellular signaling pathways, thus mediating its inhibitory effect on the initiation, promotion and progression of carcinogenesis [32]. In addition, resveratrol exhibits anti-aging and potent antioxidant properties [33], as well as an anti-inflammatory activity, where resveratrol was shown to reduce the secretion and expression of inflammatory factors [34]. Besides, resveratrol has been reported to exhibit a potent anti-viral activity not only against RNA viruses such as influenza virus [35], rhinovirus [36], rotavirus [37], Zika virus [38] and MERS-CoV [39], but also against a few DNA viruses including poxvirus [40] and polyomavirus [41]. In the context of anti-MERS-CoV activities in vitro, resveratrol was shown to inhibit the viral nucleocapsid protein translation and MERS-CoV-induced caspase 3 cleavage, which can promote cell survival and reduce virus-induced apoptosis [39]. Interestingly, resveratrol increases the expression of ACE2 on the cell surface, which has been previously reported to be beneficial for SARS-CoV-2 patients [42,43]. In fact, low levels of ACE2 are observed in Covid-19 patients with poor prognosis and hyperinflammatory storm [44]. In addition, resveratrol is a known activator of sirtuin 1 (SIRT1), which downregulates the expression of AT1R of the PRR/ACE/AngII/AT1R axis and enhances the ACE2/Ang 1-7/MasR axis [45]. Increase in the ACE2/Ang1-7/MasR axis has been reported to reduce hyperinflammation in Covid-19 patients [44]. In the present study, we assessed the anti-coronavirus activity of the seven abovementioned drugs with special emphasis on the impact of resveratrol on HCoV-229E and SARS-CoV-2 compared to lopinavir/ritonavir and chloroquine.

2. Materials and Methods

2.1. Viruses and Reagents Preparation

HCoV-229E was isolated from nasal and throat swabs collected from a man with mild upper respiratory illness (Human Coronavirus 229E ATCC VR-740) and propagated using MRC5 cells (RD Biotech, Besançon, France). HCoV-229E stock virus (5 log PFU/mL) was prepared in MRC5 cells in DMEM media supplemented with 10% FCS. SARS-CoV-2 strain was provided by the Institut Pasteur, Paris (strain BetaCov/France). Compounds were sourced from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA, resveratrol, chloroquine diphosphate), Pfizer, (New York, NY, USA, rapamycin), Sanofi (Paris, France, valproic acid or VPA, disulfiram), Abbott (Chicago, IL, USA, lopinavir/ritonavir) and Sandoz (Holzkirchen, Germany, loperamide). The stocks were prepared with DMSO (200 mM resveratrol, 50 mM lopinavir/ritonavir, 1 mM rapamycin, 2.5 mM VPA, 10 mM loperamide, 10 mM disulfiram) or with DMEM media (1 mM chloroquine diphosphate).

2.2. Viral Replication Inhibition Assay

To evaluate the effect of compounds in vitro, MRC5 cells were treated with compounds diluted in culture media at time of infection by HCoV-229E at multiplicity of infection (MOI) = 0.01 (low titer) or 1 (high titer). Antiviral compounds were maintained with the virus inoculum during the 2 h incubation period. The inoculum was removed after incubation, and the cells were overlaid with culture media containing diluted compounds. After 48 h of incubation at 37 °C, supernatants were collected to quantify viral

loads by plaque forming unit (PFU) assay as previously described [46]. Briefly, MRC5 cells were infected with the supernatant for 2 h and then overlaid with culture media containing agarose (1%). Cells were incubated for 48 h. Plaque formation was observed under a light microscope. Cells were stained with MTT for 1 hour and plaque forming units were counted. Four-parameter logistic regression (IC50 Toolkit IC50.org) was used to fit the dose–response curves and determine the 50% effective concentrations (EC50) of the compounds that inhibit viral replication by 50%. Vero E6 cells were treated with compounds at time of infection by SARS-CoV-2 (BetaCoV/France, Institut Pasteur). The viral inoculum was removed after incubation and the cells were overlaid with fresh media containing the compound. After 48 h of incubation at 37 °C, supernatants were collected to quantify viral loads. Viral RNA was extracted using a guanidinium thiocyanate buffer and magnetic silica beads. Finally, RNA was detected for the SARS-CoV-2 envelop (E) gene using one step qRT-PCR (TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix, Applied Biosystem) and the primers designed by Corman et al. [47]. Briefly, the SARS-CoV-2 envelop gene was amplified using E_Sarbeco_F 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3' and E_Sarbeco_R 5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3' primers. Detection of amplification was done using a specific SARS-CoV-2 envelop probe (E_Sarbeco_P1) 5'-FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1-3'.

2.3. Cytotoxicity Assays

Cytotoxicity of selected compounds was evaluated in MRC5 cells using MTT assay. Briefly, cells were treated with compounds for 48 h. Culture media was replaced and cells were incubated with MTT (1.2 mM, Life Technologies, Eugene, OR, USA) for 2 h. Formazan crystals were dissolved by addition of acidic isopropanol and cell viability was measured by a spectrophotometer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Cytotoxicity of compounds on Vero E6 cells was measured using several cytotoxic assays, including a WST-1 assay (Roche, Basel, Switzerland). The cytotoxic concentration 50 (CC50) is the concentration of compound that reduced cell viability by 50%. This was calculated using four-parameter logistic regression (IC50 Toolkit IC50.org).

Selectivity index (SI) was calculated by dividing CC50 by EC50 for each compound and virus tested. The selectivity index is an indicator that measures the window between cytotoxicity and antiviral activity. A high selectivity index reflects a low toxicity at concentrations that show an effective antiviral activity. It also indicates that there is an important range of concentrations showing an effective antiviral effect with minimal toxicity. Conversely, a low selectivity index would indicate an important toxicity for concentrations with effective antiviral activity.

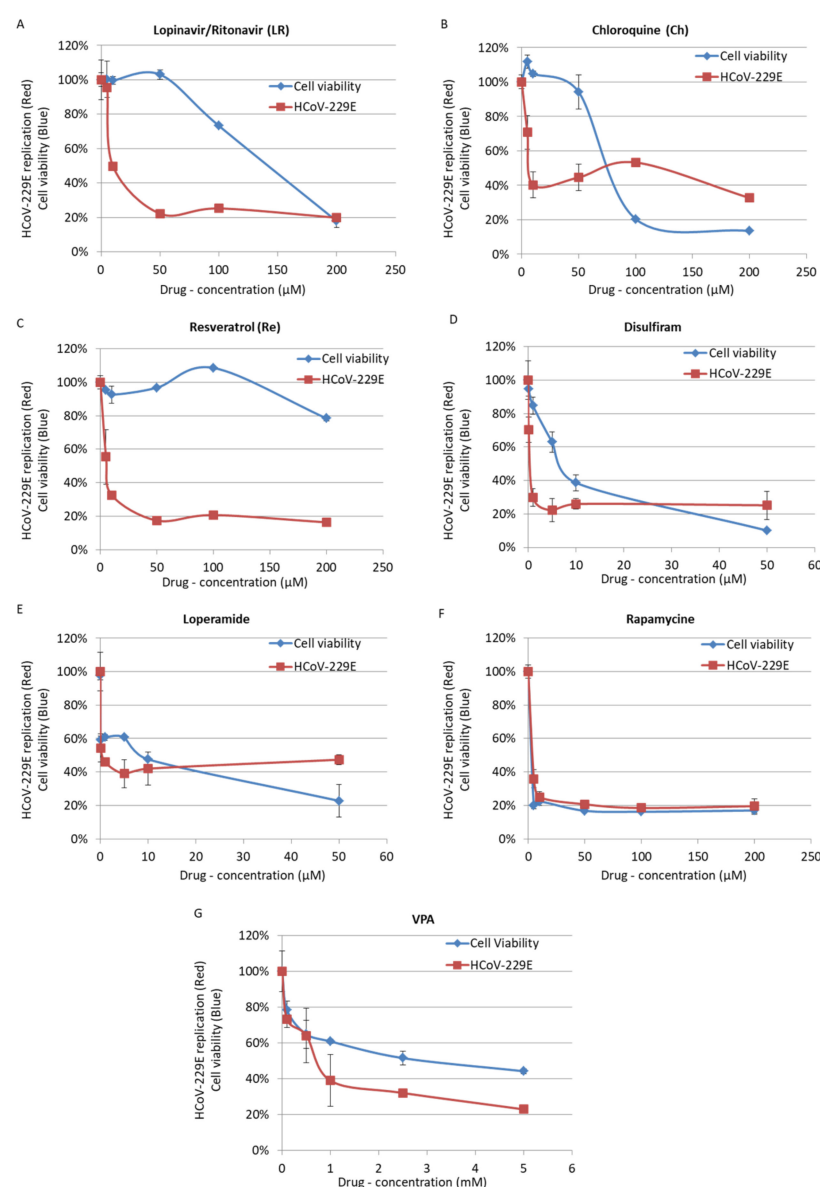
3. Results

VPA, disulfiram, rapamycin and loperamide showed cytotoxicity on MRC5 cells with a CC50 of 4 mM, 8.4 µM, 2.5 µM, and 10.1 µM, respectively (Table 1, Figure 1). In addition, rapamycin and VPA display a narrowed selectivity index (SI) of 1.09 and 2.98, respectively (Table 1, Figure 1). By contrast, lopinavir/ritonavir, chloroquine and resveratrol were found to inhibit HCoV-229E replication in MRC5 cells with low cytotoxicity and an SI ranging from 11.6 to 45.6 (Table 1), and were tested further.

In line with previous reports [19], we observed an EC50 of 8.81 µM for lopinavir on HCoV-229E-treated MRC5 cells. We observed an antiviral effect of 50 µM lopinavir/ritonavir against high titers of HCoV-229E (MOI = 1) with approximately 80% inhibition of viral replication in vitro (Figure 1 and Table 1). Against low titers of HCoV-229E (MOI = 0.01), we observed a 63% inhibition of viral replication in cells treated with 10 µM of lopinavir/ritonavir (Figure 2). As combinational therapy of effective compounds against SARS-CoV-2 virus might convey additional benefits in terms of synergy and inhibitory concentration reduction [48], we therefore tested combinatory treatment of lopinavir/ritonavir with chloroquine and resveratrol. However, we did not observe a significant decrease in HCoV-229E in culture versus lopinavir/ritonavir when used alone (Figure 2B).

Table 1. The 50% effective concentration (EC₅₀), cytotoxic concentration 50 (CC₅₀) and selectivity index (SI) for the seven drugs tested for human coronavirus (HCoV)-229E replication in MRC5 cells.

Drug Tested	CC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	SI
Lopinavir/Ritonavir	102.5	8.8163	11.62619
Chloroquine	67.9	5	13.58
Resveratrol	210	4.6	45.65217
Rapamycin	2.5	2.28	1.096491
Disulfiram	8.4	0.1387	60.56236
Loperamide	10.1	0.094732	106.6166
VPA	4 mM	1.339 mM	2.987304

**Figure 1.** Inhibition of replication of high HCoV-229E viral load (Red), measured by plaque forming unit (PFU) assay, coupled with MTT toxicity assay (Blue) for Lopinavir/Ritonavir (A), Chloroquine (B), Resveratrol (C), Disulfiram (D), Loperamide (E), Rapamycin (F) and valproic acid (VPA) (G). Cells were treated by compounds at the time of infection with HCoV-229E (1 multiplicity of infection (MOI)). PFU and MTT assays were performed after 48 h. Uninfected cells were used for normalization of MTT assay. Untreated cells infected with HCoV-229E were used for normalization of PFU assay.

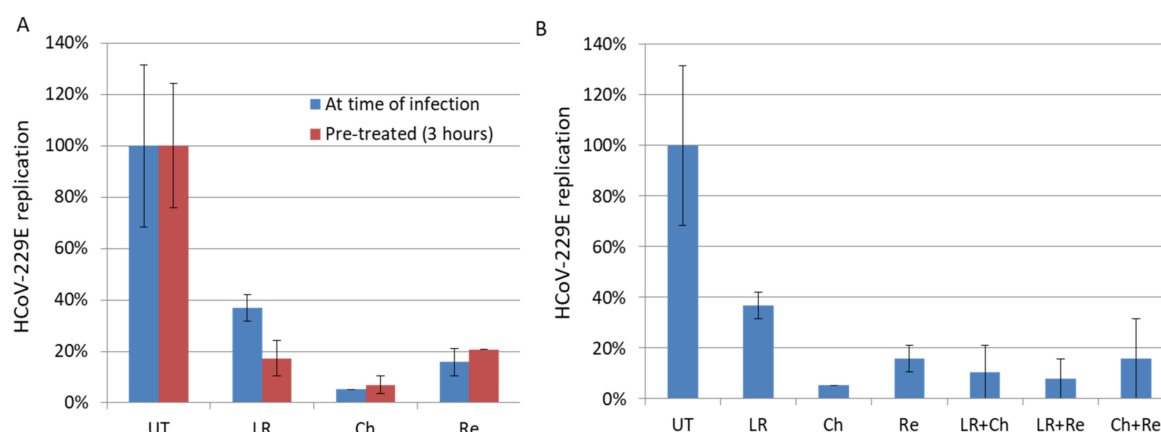


Figure 2. Inhibition of replication of low HCoV-229E viral load (0.01 MOI) by drugs. **(A)** No pretreatment (Blue) or 3-h pretreatment of cells (Red). **(B)** Combination of drugs. The cells were treated with Lopinavir/Ritonavir (LR), Chloroquine (Ch), Resveratrol (Re) or left untreated (UT) for 48 h. The viral replication was measured by PFU assay.

As reported previously, we observed that chloroquine inhibits HCoV-229E replication in MRC5 cells when added 3 h before infection but also when added at the time of infection (Figure 2). We also observed that chloroquine inhibits the replication of HCoV-229E in cells infected with a high titer of virus (EC_{50} of 5 μ M; Figure 1). This is in agreement with the antiviral activity of hydroxychloroquine, a chloroquine derivative, with an EC_{90} of 5.47 μ M in the context of SARS-CoV-2 infection [49]. We did not observe a synergistic effect of chloroquine used in combinatory treatments with lopinavir/ritonavir or resveratrol (Figure 2b). We also did not observe a significant difference in the effect of chloroquine when cells were treated before or after the infection (Figure 3). We observed some cytotoxicity of chloroquine on treated cells, with a CC_{50} of 67.9 μ M (Figure 1 and Table 1).

Here, we observed that resveratrol inhibits HCoV-229E replication in MRC5 cells infected with a high viral titer ($MOI = 1$), with an EC_{50} of 4.6 μ M (Figure 1 and Table 1). We also observed an inhibition of replication in cells infected with a low viral titer ($MOI = 0.01$) and treated with resveratrol (Figure 2). We did not observe a significant difference in the effect of resveratrol when cells were treated before or after the infection (Figure 3). We did not observe any synergistic effect of resveratrol used in combination with lopinavir/ritonavir or chloroquine (Figure 2b). Resveratrol displayed a low toxicity in treated cells, with a CC_{50} of 210 μ M and a selectivity index (SI) equal to 45.65 (Figure 1 and Table 1). Based on the results obtained for HCoV-229E, we performed testing for SARS-CoV-2 inhibition. Treatment of Vero E6 cells with lopinavir/ritonavir and chloroquine was toxic and did not allow for the study of their anti-SARS-CoV-2 effect (Figure 4a). The important cell lysis in culture prevented an accurate measure of SARS-CoV-2 replication, giving partial and unreliable results (Figure 4b). In contrast, the cytotoxicity of resveratrol on Vero E6 cells occurred at concentrations higher than 50 μ M (Figure 4a). We observed that resveratrol inhibited SARS-CoV-2 replication by 3 logs at 25 μ M (Figure 4b). The percentage of inhibition of SARS-CoV-2 ranges from 0 to 99.93% when increasing the concentration of resveratrol from 0 to 25 μ M with an EC_{90} and EC_{50} of 11.42 μ M and 10.66 μ M, respectively (Figure 4). A very limited reduction in cell viability was also observed in Vero E6 cells treated with resveratrol at 50 μ M, overall leading to a $CC_{50} = 48.21$ μ M and an SI of 4.52. The inhibition of SARS-CoV-2 replication we observed in cells treated with resveratrol did not follow the reduction in cell viability and was a genuine anti-SARS-CoV-2 effect of resveratrol in vitro.

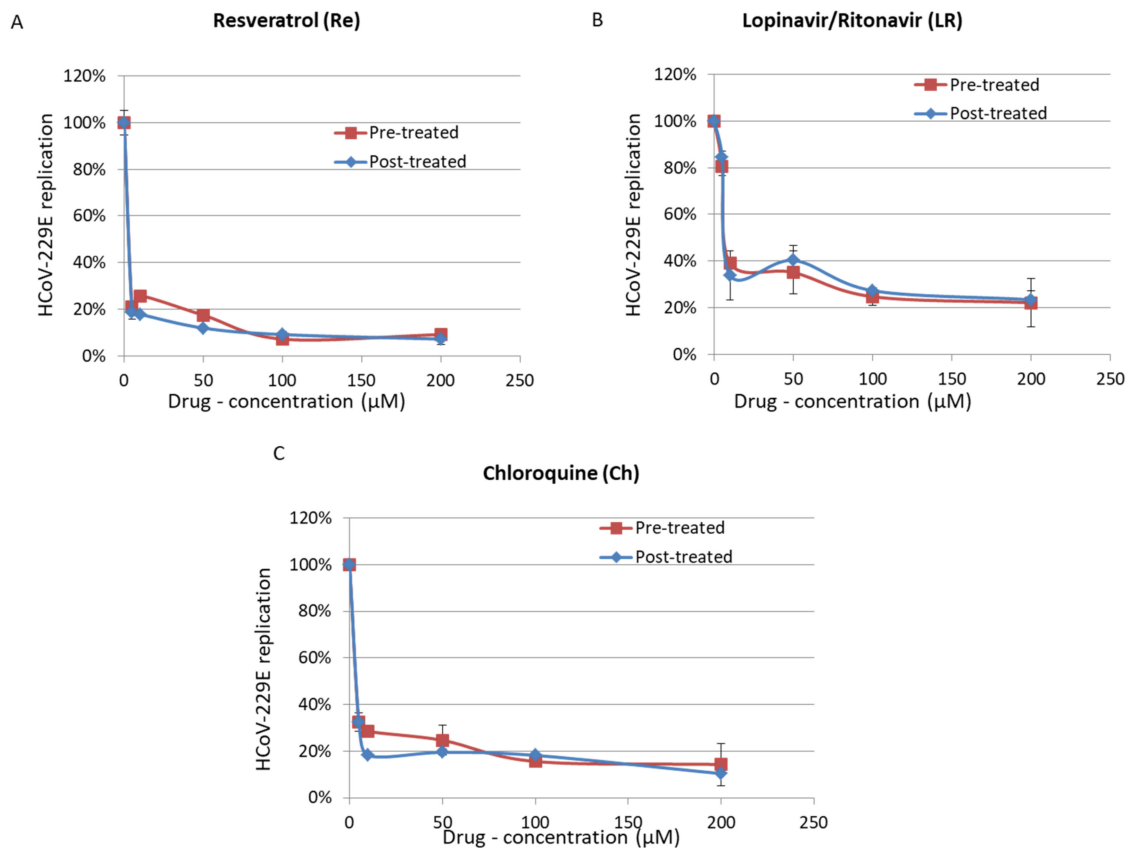


Figure 3. Inhibition of replication of high HCoV-229E viral load (1 MOI) by Resveratrol (A), Lopinavir/Ritonavir (B) and Chloroquine (C) in pre-treated (3 h, Red) or post-treated (4 h, Blue) MRC5 cells. Viral replication was measured by PFU assay after 48 h.

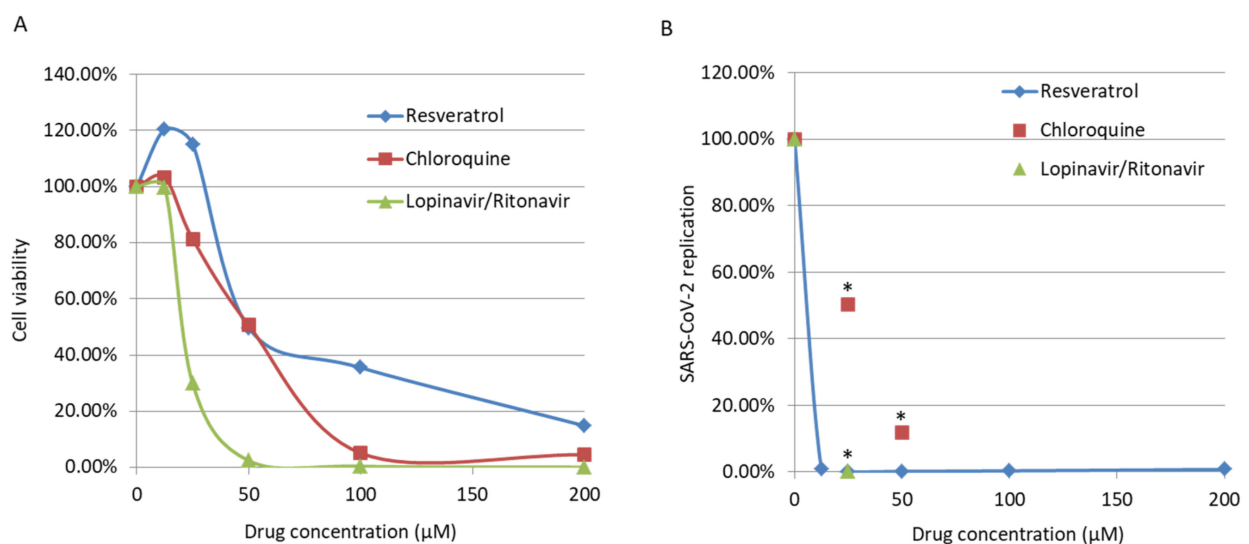


Figure 4. (A) Toxicity assay for Lopinavir/Ritonavir, Chloroquine and Resveratrol in Vero E6 cells, after 48 h. (B) Inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) replication in Vero E6 cells treated with Resveratrol as measured by qRT-PCR after 48 h. * Cytotoxicity impaired the evaluation of the anti-SARS-CoV-2 effect of Lopinavir/Ritonavir and Chloroquine.

4. Discussion

We confirm the antiviral activity of two compounds (lopinavir/ritonavir and chloroquine) that have been reported previously to inhibit HCoV-229E replication in vitro. In addition, we show the antiviral effect of resveratrol on HCoV-229E and SARS-CoV-2 replication in vitro. In addition, resveratrol is the most powerful compound with an EC₅₀ of 4.6 μ M, a CC₅₀ of 210 μ M and an SI of 45.65, indicating that it could be efficiently used to fight HCoV-229E infection. While their SI is lower, lopinavir/ritonavir and chloroquine might show clinical potential. For instance, it has been observed that HIV patients might reach minimal lopinavir serum concentration at 9.4 μ M (IQR 7.2–12.1 μ M) upon twice daily treatment with 400 mg lopinavir and 100 mg ritonavir [50], which is in the same range of the EC₅₀ against HCoV-229E virus in vitro (8.8 μ M). The previously mentioned dosing regimen has been recommended by the by Chinese National Health Commission in the management of SARS-CoV-2 patients [51]. Nonetheless, no differences in time of clinical improvement, mortality at 28 days and detectable viral loads at various time points were reported between the lopinavir/ritonavir group and the standard-care group in a recent randomized, controlled, open-label trial [22]. Overall, a beneficial effect of lopinavir/ritonavir and chloroquine in Covid-19 patients is still highly debated.

We observed a high cytotoxicity of lopinavir/ritonavir and chloroquine on Vero E6 cells, which precluded the study of their anti-SARS-CoV-2 effect. In fact, several studies have already evaluated the anti-SARS-CoV-2 effect of drugs including lopinavir and chloroquine [48,49]. While most studies showed an antiviral effect in vitro for these two drugs that would warrant further investigation, they also indicated cytotoxicity of these drugs. The cytotoxicity we observed for lopinavir/ritonavir and chloroquine in the present study is in line with these previous reports [48,49].

In contrast to lopinavir/ritonavir and chloroquine, our testing for SARS-CoV-2 inhibition shows a genuine anti-viral effect of resveratrol. We observed a significant decrease in SARS-CoV-2 replication under non-cytotoxic doses of resveratrol up to 25 μ M in vitro. To further confirm the anti-SARS-CoV-2 effect of resveratrol using an in vitro model closer to the in vivo pathophysiology, we will assess in future studies the anti-SARS-CoV-2 effect of resveratrol using organotypic nasal epithelial cultures, which might better reflect the pathophysiology of SARS-CoV-2 infection compared with the renal epithelial Vero E6 cells. During the revision process of our manuscript, new reports that showed the effect of resveratrol on SARS-CoV-2 replication became available. Yang et al. reported the inhibition of SARS-CoV-2 replication by resveratrol, with an EC₅₀ of 4.48 μ M, which is in line with our findings [52]. In a study yet to be published, Ter Ellen and colleagues showed that resveratrol and the structurally related molecule pterostilbene both inhibited the replication of SARS-CoV-2, especially in primary human bronchial epithelium cells [53].

Although resveratrol, which displays both antiviral and anti-inflammatory properties, could be an interesting treatment for Covid-19 patients [54], its use is limited by poor bioavailability. Multiple strategies have been employed to overcome the poor bioavailability of resveratrol in vivo [55], including a soluble formulation of trans-resveratrol [56] and its administration as a nasal spray [57]. Although administered doses vary widely between 10 mg and 5 g [58], previous pharmacokinetic studies showed that patients receiving a single 500 mg oral dose of resveratrol might reach an adequate plasma concentration to promote the pharmacological activities of 71.2 ± 42.4 ng/mL e.g., 0.31 μ M, with a T_{max} of 1.3 h [59]. In addition, nasal administration to expose the lungs to resveratrol reduced tumor volume and tumor multiplicity by 45% and 27%, respectively, in A/J mice with lung cancer [60]. In Covid-19 patients hospitalized in emergency units, the use of naso-tracheal administration of resveratrol might allow for direct delivery of the treatment into the lung and could provide maximum antiviral and anti-inflammatory efficiency.

In conclusion, further testing is needed to confirm whether resveratrol, either alone or in combination therapy, could be of use in a clinical setting. Finally, it is important to note that our results on SARS-CoV-2 inhibition by resveratrol are in vitro data and do not

indicate that resveratrol can be used to treat Covid-19 until double-blinded clinical assays have been successfully performed.

5. Conclusions

We confirm the anti-HCoV-229E activity of two compounds, lopinavir/ritonavir and chloroquine, that have been previously reported to inhibit HCoV-229E replication in vitro. In addition, we show here the antiviral effect of resveratrol on HCoV-229E and SARS-CoV-2 replication in vitro. Resveratrol is the most powerful compound to fight HCoV-229E infection with an EC₅₀ of 4.6 μ M, a CC₅₀ of 210 μ M and an SI of 45.65. In addition, our testing for SARS-CoV-2 inhibition shows an anti-viral effect of resveratrol in vitro, which will be assessed in future studies in organotypic nasal epithelial cultures. This will better reflect the pathophysiology of Covid-19 infection and might lead to its use in a clinical setting, either alone or as part of a combined treatment against Covid-19.

Author Contributions: Conceptualization, G.H.; formal analysis, S.P., S.H.A., Z.N., F.D., J.V.A. and C.W.; investigation, S.P., Z.N., S.H.A., F.D., J.V.A., C.W., C.S. and S.M.-B.; writing—original draft preparation, S.P., Z.N., S.M.-B. and G.H.; writing—review and editing, S.P., Z.N., S.H.A., S.M.-B., F.D., J.V.A., C.W., C.S., O.R. and G.H.; visualization, S.P.; supervision, G.H.; project administration, G.H.; funding acquisition, G.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by University of Franche-Comté and the University of Bourgogne-Franche-Comté.

Data Availability Statement: The data presented in this study is available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Phan, M.V.T.; Ngo Tri, T.; Hong Anh, P.; Baker, S.; Kellam, P.; Cotten, M. Identification and characterization of Coronaviridae genomes from Vietnamese bats and rats based on conserved protein domains. *Virus Evol.* **2018**, *4*, 35. [\[CrossRef\]](#)
- Lim, Y.X.; Ng, Y.L.; Tam, J.P.; Liu, D.X. Human Coronaviruses: A Review of Virus–Host Interactions. *Diseases* **2016**, *4*, 26. [\[CrossRef\]](#)
- Chan, J.F.-W.; Kok, K.-H.; Zhu, Z.; Chu, H.; To, K.K.-W.; Yuan, S.; Yuen, K.-Y. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 221–236. [\[CrossRef\]](#)
- Van der Hoek, L. Human coronaviruses: What do they cause? *Antivir. Ther.* **2007**, *12*, 651–658.
- Fehr, A.R.; Perlman, S. Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1282*, 1–23.
- Zheng, J. SARS-CoV-2: An Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat. *Int. J. Biol. Sci.* **2020**, *16*, 1678–1685. [\[CrossRef\]](#)
- Geng, Y.-J.; Wei, Z.-Y.; Qian, H.-Y.; Huang, J.; Lodato, R.; Castriotta, R.J. Pathophysiological Characteristics and Therapeutic Approaches for Pulmonary Injury and Cardiovascular Complications of Coronavirus Disease 2019. *Cardiovasc. Pathol.* **2020**, *17*, 107228. [\[CrossRef\]](#)
- Krammer, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature* **2020**, *586*, 516–527. [\[CrossRef\]](#)
- Sanders, J.M.; Monogue, M.L.; Jodlowski, T.Z.; Cutrell, J.B. Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA* **2020**, *323*, 1824–1836. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, W.-H.; Strych, U.; Hotez, P.J.; Bottazzi, M.E. The SARS-CoV-2 Vaccine Pipeline: An Overview. *Curr. Trop. Med. Rep.* **2020**, *3*, 1–4. [\[CrossRef\]](#)
- Zhou, Y.; Hou, Y.; Shen, J.; Huang, Y.; Martin, W.; Cheng, F. Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. *Cell Discov.* **2020**, *6*, 1–18. [\[CrossRef\]](#)
- Pyrce, K.; Berkhout, B.; van der Hoek, L. Antiviral strategies against human coronaviruses. *Infect. Disord. Drug Targets* **2007**, *7*, 59–66. [\[CrossRef\]](#)
- Li, G.; De Clercq, E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 149–150. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chateauvieux, S.; Morceau, F.; Dicato, M.; Diederich, M. Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, *2010*, 479364. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

15. Napolitano, F.; Gambardella, G.; Gao, X.; di Bernardo, D. Computational Drug Repositioning and Elucidation of Mechanism of Action of Compounds against sars-cov-2. *arXiv* **2020**, arXiv:2004.07697.
16. Lin, M.-H.; Moses, D.C.; Hsieh, C.-H.; Cheng, S.-C.; Chen, Y.-H.; Sun, C.-Y.; Chou, C.-Y. Disulfiram can inhibit MERS and SARS coronavirus papain-like proteases via different modes. *Antivir. Res.* **2018**, *150*, 155–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Dyall, J.; Gross, R.; Kindrachuk, J.; Johnson, R.F.; Olinger, G.G.; Hensley, L.E.; Frieman, M.B.; Jahrling, P.B. Middle East Respiratory Syndrome and Severe Acute Respiratory Syndrome: Current Therapeutic Options and Potential Targets for Novel Therapies. *Drugs* **2017**, *77*, 1935–1966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Jeon, S.; Ko, M.; Lee, J.; Choi, I.; Byun, S.Y.; Park, S.; Shum, D.; Kim, S. Identification of Antiviral Drug Candidates against SARS-CoV-2 from FDA-Approved Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. De Wilde, A.H.; Jochmans, D.; Posthuma, C.C.; Zevenhoven-Dobbe, J.C.; van Nieuwkoop, S.; Bestebroer, T.M.; van den Hoogen, B.G.; Neyts, J.; Snijder, E.J. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 4875–4884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Chandwani, A.; Shuter, J. Lopinavir/ritonavir in the treatment of HIV-1 infection: A review. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2008**, *4*, 1023–1033. [[PubMed](#)]
21. Chu, C.M.; Cheng, V.C.C.; Hung, I.F.N.; Wong, M.M.L.; Chan, K.H.; Chan, K.S.; Kao, R.Y.T.; Poon, L.L.M.; Wong, C.L.P.; Guan, Y.; et al. Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS: Initial virological and clinical findings. *Thorax* **2004**, *59*, 252–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Cao, B.; Wang, Y.; Wen, D.; Liu, W.; Wang, J.; Fan, G.; Ruan, L.; Song, B.; Cai, Y.; Wei, M.; et al. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1787–1799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. ClinicalTrials.gov. Bethesda (MD) National Library of Medicine (US) Identifier NCT00578825, A Multi-centre, Double-Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Trial on the Efficacy and Safety of Lopinavir/Ritonavir Plus Ribavirin in the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00578825> (accessed on 11 May 2020).
24. Plantone, D.; Koudriavtseva, T. Current and Future Use of Chloroquine and Hydroxychloroquine in Infectious, Immune, Neoplastic, and Neurological Diseases: A Mini-Review. *Clin. Drug Investig.* **2018**, *38*, 653–671. [[CrossRef](#)]
25. Savarino, A.; Boelaert, J.R.; Cassone, A.; Majori, G.; Cauda, R. Effects of chloroquine on viral infections: An old drug against today's diseases? *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 722–727. [[CrossRef](#)]
26. Devaux, C.A.; Rolain, J.-M.; Colson, P.; Raoult, D. New insights on the antiviral effects of chloroquine against coronavirus: What to expect for COVID-19? *Int. J. Antimicrob. Agents* **2020**, *55*, 105938. [[CrossRef](#)]
27. Wang, M.; Cao, R.; Zhang, L.; Yang, X.; Liu, J.; Xu, M.; Shi, Z.; Hu, Z.; Zhong, W.; Xiao, G. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* **2020**, *30*, 269–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Gao, J.; Tian, Z.; Yang, X. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. *Biosci. Trends* **2020**, *14*, 72–73. [[CrossRef](#)]
29. Lythgoe, M.P.; Middleton, P. Ongoing Clinical Trials for the Management of the COVID-19 Pandemic. *Trends Pharm. Sci.* **2020**, *41*, 363–382. [[CrossRef](#)]
30. Hoffmann, M.; Mösbauer, K.; Hofmann-Winkler, H.; Kaul, A.; Kleine-Weber, H.; Krüger, N.; Gassen, N.C.; Müller, M.A.; Drosten, C.; Pöhlmann, S. Chloroquine does not inhibit infection of human lung cells with SARS-CoV-2. *Nature* **2020**, *585*, 588–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Salehi, B.; Mishra, A.P.; Nigam, M.; Sener, B.; Kilic, M.; Sharifi-Rad, M.; Fokou, P.V.T.; Martins, N.; Sharifi-Rad, J. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines* **2018**, *6*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ko, J.-H.; Sethi, G.; Um, J.-Y.; Shanmugam, M.K.; Arfuso, F.; Kumar, A.P.; Bishayee, A.; Ahn, K.S. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2589. [[CrossRef](#)]
33. Camins, A.; Junyent, F.; Verdaguer, E.; Beas-Zarate, C.; Rojas-Mayorquín, A.E.; Ortuño-Sahagún, D.; Pallàs, M. Resveratrol: An Antiaging Drug with Potential Therapeutic Applications in Treating Diseases. *Pharmaceuticals* **2009**, *2*, 194–205. [[CrossRef](#)]
34. Zhou, Z.-X.; Mou, S.-F.; Chen, X.-Q.; Gong, L.-L.; Ge, W.-S. Anti-inflammatory activity of resveratrol prevents inflammation by inhibiting NF-κB in animal models of acute pharyngitis. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 1269–1274. [[CrossRef](#)]
35. Palamara, A.T.; Nencioni, L.; Aquilano, K.; De Chiara, G.; Hernandez, L.; Cozzolino, F.; Ciriolo, M.R.; Garaci, E. Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *J. Infect. Dis.* **2005**, *191*, 1719–1729. [[CrossRef](#)]
36. Mastromarino, P.; Capobianco, D.; Cannata, F.; Nardis, C.; Mattia, E.; De Leo, A.; Restignoli, R.; Francioso, A.; Mosca, L. Resveratrol inhibits rhinovirus replication and expression of inflammatory mediators in nasal epithelia. *Antivir. Res.* **2015**, *123*, 15–21. [[CrossRef](#)]
37. Huang, H.; Liao, D.; Zhou, G.; Zhu, Z.; Cui, Y.; Pu, R. Antiviral activities of resveratrol against rotavirus in vitro and in vivo. *Phytomedicine* **2020**, *77*, 153230. [[CrossRef](#)]
38. Mohd, A.; Zainal, N.; Tan, K.-K.; AbuBakar, S. Resveratrol affects Zika virus replication in vitro. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Lin, S.-C.; Ho, C.-T.; Chuo, W.-H.; Li, S.; Wang, T.T.; Lin, C.-C. Effective inhibition of MERS-CoV infection by resveratrol. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 144. [[CrossRef](#)]
40. Cao, S.; Realegeno, S.; Pant, A.; Satheshkumar, P.S.; Yang, Z. Suppression of Poxvirus Replication by Resveratrol. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2196. [[CrossRef](#)]

41. Berardi, V.; Ricci, F.; Castelli, M.; Galati, G.; Risuleo, G. Resveratrol exhibits a strong cytotoxic activity in cultured cells and has an antiviral action against polyomavirus: Potential clinical use. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2009**, *28*, 96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kim, E.N.; Kim, M.Y.; Lim, J.H.; Kim, Y.; Shin, S.J.; Park, C.W.; Kim, Y.-S.; Chang, Y.S.; Yoon, H.E.; Choi, B.S. The protective effect of resveratrol on vascular aging by modulation of the renin–angiotensin system. *Atherosclerosis* **2018**, *270*, 123–131. [[CrossRef](#)]
43. Cheng, H.; Wang, Y.; Wang, G.-Q. Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19. *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 726–730. [[CrossRef](#)]
44. Verdecchia, P.; Cavallini, C.; Spanevello, A.; Angeli, F. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection. *Eur. J. Intern. Med.* **2020**, *10*, 1016.
45. Jang, I.-A.; Kim, E.N.; Lim, J.H.; Kim, M.Y.; Ban, T.H.; Yoon, H.E.; Park, C.W.; Chang, Y.S.; Choi, B.S. Effects of Resveratrol on the Renin-Angiotensin System in the Aging Kidney. *Nutrients* **2018**, *10*, 1741. [[CrossRef](#)]
46. Baer, A.; Kehn-Hall, K. Viral concentration determination through plaque assays: Using traditional and novel overlay systems. *J. Vis. Exp.* **2014**, *93*, e52065. [[CrossRef](#)]
47. Corman, V.M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D.K.; Bleicker, T.; Brünink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M.L.; et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* **2020**, *25*, 2000045. [[CrossRef](#)]
48. Choy, K.-T.; Wong, A.Y.-L.; Kaewpreedee, P.; Sia, S.F.; Chen, D.; Hui, K.P.Y.; Chu, D.K.W.; Chan, M.C.W.; Cheung, P.P.-H.; Huang, X.; et al. Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antivir. Res.* **2020**, *178*, 104786. [[CrossRef](#)]
49. Gordon, D.E.; Jang, G.M.; Bouhaddou, M.; Xu, J.; Obernier, K.; White, K.M.; O’Meara, M.J.; Rezelj, V.V.; Guo, J.Z.; Swaney, D.L.; et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* **2020**, *583*, 1–13. [[CrossRef](#)]
50. Lopez-Cortes, L.F.; Ruiz-Valderas, R.; Sánchez-Rivas, E.; Lluch, A.; Gutierrez-Valencia, A.; Torres-Cornejo, A.; BenMarzouk-Hidalgo, O.J.; Vician, P. Lopinavir Plasma Concentrations and Virological Outcome with Lopinavir-Ritonavir Monotherapy in HIV-1-Infected Patients. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2013**, *57*, 3746–3751. [[CrossRef](#)]
51. Peng, F.; Tu, L.; Yang, Y.; Hu, P.; Wang, R.; Hu, Q.; Cao, F.; Jiang, T.; Sun, J.; Xu, G.; et al. Management and Treatment of COVID-19: The Chinese Experience. *Can. J. Cardiol.* **2020**, *36*, 915–930. [[CrossRef](#)]
52. Yang, M.; Wei, J.; Huang, T.; Lei, L.; Shen, C.; Lai, J.; Yang, M.; Liu, L.; Yang, Y.; Liu, G.; et al. Resveratrol inhibits the replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in cultured Vero cells. *Phytother. Res.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ter Ellen, B.M.; Kumar, N.D.; Bouma, E.M.; Troost, B.; van de Pol, D.P.; van der Ende-Metselaar, H.H.; Apperloo, L.; van Gosliga, D.; van den Berge, M.; Nawijn, M.C.; et al. Resveratrol And Pterostilbene Potently Inhibit SARS-CoV-2 Replication In Vitro. *bioRxiv* **2020**, 285940.
54. Wahedi, H.M.; Ahmad, S.; Abbasi, S.W. Stilbene-based natural compounds as promising drug candidates against COVID-19. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Gambini, J.; Inglés, M.; Olaso, G.; Lopez-Grueso, R.; Bonet-Costa, V.; Gimeno-Mallench, L.; Mas-Bargues, C.; Abdelaziz, K.M.; Gomez-Cabrera, M.C.; Vina, J.; et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 837042. [[CrossRef](#)]
56. Amiot, M.J.; Romier, B.; Dao, T.-M.A.; Fanciullino, R.; Ciccolini, J.; Burcelin, R.; Pechere, L.; Emond, C.; Savouret, J.-F.; Seree, E. Optimization of trans-Resveratrol bioavailability for human therapy. *Biochimie* **2013**, *95*, 1233–1238. [[CrossRef](#)]
57. Lv, C.; Zhang, Y.; Shen, L. Preliminary Clinical Effect Evaluation of Resveratrol in Adults with Allergic Rhinitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2018**, *175*, 231–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Tomé-Carneiro, J.; Larrosa, M.; González-Sarrias, A.; Tomás-Barberán, F.A.; García-Conesa, M.T.; Espín, J.C. Resveratrol and Clinical Trials: The Crossroad from In Vitro Studies to Human Evidence. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 6064–6093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Sergides, C.; Chirilă, M.; Silvestro, L.; Pitta, D.; Pittas, A. Bioavailability and safety study of resveratrol 500 mg tablets in healthy male and female volunteers. *Exp. Ther. Med.* **2016**, *11*, 164–170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Monteillier, A.; Voisin, A.; Furrer, P.; Allémann, E.; Cuendet, M. Intranasal administration of resveratrol successfully prevents lung cancer in A/J mice. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 14257. [[CrossRef](#)]

Rôle des partenaires de CTIP2 dans la latence post-intégrative du VIH-1

Importance de la voie SUMO

Résumé

Les antirétroviraux permettent de contenir l'expression du VIH-1 mais ne permettent pas son éradication. En cause, des cellules infectées par un virus latent appelées réservoirs, principal frein à l'éradication. Des nouvelles stratégies de guérison ont émergé afin de les supprimer. Mais la mise en place de ces stratégies nécessite une compréhension fine des mécanismes qui régissent la latence. Notre laboratoire étudie la latence dans les cellules microgliales qui sont un important réservoir du VIH-1. Le rôle central du facteur de transcription cellulaire CTIP2 dans la latence de ces cellules a été mis en évidence par le laboratoire. Il recrute au niveau du promoteur viral des complexes répresseurs de la transcription. Récemment, nous avons identifié un complexe associant CTIP2 à la SUMOylation. Ici nous démontrons l'effet répresseur de la SUMOylation sur la transcription et la réplication du VIH-1. Les marques SUMO1 et SUMO2/3 sont présentes sur le promoteur viral latent. De plus, la SUMOylation participe à la dégradation de la protéine virale Tat par la voie du protéasome. Enfin, certaines combinaisons d'inhibiteurs de SUMO et d'inhibiteurs de HDAC réactivent les cellules microgliales latentes. En conclusion, nous démontrons l'effet répresseur de la SUMOylation sur l'expression du VIH-1 ainsi que sur Tat.

Mots clés : VIH-1 ; latence ; CTIP2 ; SUMOylation ; transcription

Abstract

Antiretroviral therapy suppresses HIV-1 expression but is not able to eradicate the virus. Latently infected cells are the main obstacle to this elimination. Thus, new therapeutic strategies emerged in order to suppress these reservoirs. However, the implementation of these strategies requires a detailed understanding of the mechanisms that govern HIV-1 latency. Our laboratory studies latency in microglial cells which are an important reservoir for HIV-1 in the brain. The central role of the cellular transcription factor CTIP2 in the latency of these cells has been demonstrated by our laboratory. CTIP2 recruits at the viral promoter, transcriptional repressor complexes inducing HIV-1 latency. We recently identified CTIP2 associated in a complex with the SUMO pathway. Here, we demonstrated that SUMOylation represses HIV-1 transcription and replication. SUMO1, SUMO2/3 marks and CTIP2 are recruited to the HIV-1 latent promoter and removed when cells are reactivated. HIV-1 Tat protein is essential for the elongation step of HIV-1 transcription. We demonstrate that SUMOylation participates to Tat degradation via the proteasome pathway. Finally, combinations of SUMO and HDAC inhibitors reactivate HIV-1 latently infected microglial cells. In conclusion, we demonstrate the repressor effect of SUMOylation on HIV-1 expression and on Tat stability. These results suggest that SUMO pathway is involved in HIV-1 post-integrative latency.

Key words : HIV-1 ; latency ; CTIP2 ; SUMOylation ; transcription