

# La latence virale du VIH-1

## *Viral latency of HIV-1*

Sophie Bouchat

Carine Van Lint

Université libre de Bruxelles (ULB),  
Service de virologie moléculaire,  
Département de biologie moléculaire,  
12, rue des Profs-Jeener-et-Brachet,  
6041 Gosselies, Belgique

**Résumé.** La latence virale du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est mise en évidence cliniquement par la persistance d'une charge virale résiduelle observée chez les patients traités, causée par la réactivation des réservoirs cellulaires. Elle peut être sous deux formes mais la contribution de la latence pré-intégrationnelle à la persistance virale reste minoritaire. Au contraire, la latence post-intégrationnelle constitue la majeure contribution de l'échappement des réservoirs cellulaires du VIH-1 au système immunitaire et, par conséquent, à la pathogenèse du VIH-1. Bien que la latence virale puisse être maintenue par des mécanismes agissant au niveau post-transcriptionnel, l'inhibition de la transcription du VIH-1 est critique pour l'établissement et le maintien de la latence post-intégrationnelle. Cette inhibition est régie par un phénomène multifactoriel, rendant complexe la mise en place de stratégies thérapeutiques anti-latence. Ces différentes notions seront abordées tout au long de cette revue.

**Mots clés :** VIH-1, latence, réservoirs, mécanismes moléculaires, transcription

**Abstract.** Human immunodeficiency virus (HIV-1) latency is clinically highlighting *via* the persistence of a residual viral load in cART-treated patients due to the reactivation of cellular reservoirs. Two forms of latency coexist but the contribution of the pre-integrationnal latency clearly plays a minor role in viral persistence. In contrast, the post-integrationnal latency significantly contributes to the evasion of the immune system by the HIV-1 cellular reservoir and consequently to HIV-1 pathogenesis. Although post-transcriptional mechanisms can contribute to the maintenance of viral latency, HIV-1 transcriptional inhibition is critical for the establishment and maintenance of post-integrationnal latency. This inhibition is a multifactorial phenomenon, making the development of anti-latency therapeutic strategies complex. These different notions will be described throughout this review.

**Key words:** HIV-1, latency, reservoirs, molecular mechanisms, transcription

## Qu'entend-on par « latence virale du VIH-1 » ?

Malgré une thérapie antirétrovirale combinée (cART) qui permet de contrôler efficacement l'infection en bloquant la réplication virale, le VIH-1 persiste chez les patients traités. La persistance virale observée chez ces patients peut être attribuée à la fois à l'existence d'une réplication virale résiduelle, notamment dans les sanctuaires anatomiques où la pénétration de la cART est sous-optimale, mais également, et de manière prédominante, à la réactivation

de l'expression virale dans des cellules infectées de manière latente [1]. La cause générale de la persistance virale se trouve dans l'existence de « réservoirs latents du VIH », définis comme un type cellulaire ou un site anatomique dans lequel des formes de virus compétentes pour la réplication persistent de façon plus stable que l'ensemble des virus qui se répliquent activement. Le VIH-1 infecte plusieurs types cellulaires qui peuvent alors représenter des réservoirs latents potentiels, cette fois-ci nommés « réservoirs cellulaires du VIH ». Ceux-ci sont essentiellement constitués de monocytes/macrophages et de cellules T CD4<sup>+</sup> [1]. Ces dernières, principalement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires au repos, représentent les réservoirs cellulaires majoritaires du VIH-1 dans le sang périphérique et dans les tissus. Ceux-ci regroupent

**Correspondance :** C. Van Lint  
<cvlint@ulb.ac.be>

une petite population présentant un/des provirus intégré(s) stablement, compétent(s) en termes de réplication mais transcriptionnellement silencieux, phénomène nommé communément « latence virale » [1]. Cette latence virale conduit à une insensibilité des réservoirs cellulaires au traitement antirétroviral et à leur échappement aux réponses du système immunitaire. La latence étant réversible suite à des stimuli cellulaires, elle joue un rôle important dans la pathogenèse du VIH-1 et représente la cause principale du rebond de la charge virale plasmatique lors de l'arrêt du traitement cART.

L'établissement d'un état d'infection latent du VIH-1 dans les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires au repos est une conséquence inattendue de la voie normale d'établissement de la mémoire immune. En effet, ce phénomène a principalement lieu lors du processus de retour à l'état de repos de cellules T CD4<sup>+</sup> activées ou partiellement activées, phénomène induit par la surexpression de facteurs négatifs régulateurs de l'activation des cellules T. Ceci affecte de manière importante l'activité transcriptionnelle du promoteur viral mais également des étapes post-transcriptionnelles, le tout constituant un environnement défavorable pour la réplication virale. Toutefois, des études récentes suggèrent qu'une infection par le VIH-1 peut s'établir indépendamment du statut d'activation des cellules, supportant la notion que l'établissement de la latence est principalement déterminé par des fluctuations aléatoires dues à un équilibre entre des stimuli activateurs et répresseurs du promoteur viral [2-4]. Par contraste à l'état activé des cellules T CD4<sup>+</sup>, Swiggard *et al.* ont mis en évidence qu'une infection directe de cellules au repos est possible [5]. Cependant, plusieurs études suggèrent que seulement une fraction mineure de cellules T CD4<sup>+</sup> infectées de manière latente serait infectée lors de l'état au repos, et ce étant donné que les étapes de transcription inverse et d'intégration se passent rarement dans ces cellules au repos dues à l'activité de plusieurs facteurs de restriction [6-8]. En effet, les cellules T CD4<sup>+</sup> au repos sont hautement réfractaires à l'infection due à un blocage au niveau de l'étape de rétrotranscription établi par le facteur cellulaire SAMHD1 [6, 9]. Cependant, certaines chimiokines peuvent faciliter les étapes précoces de l'infection dans les cellules T CD4<sup>+</sup> au repos sans pour autant activer ces cellules [10].

Suite à l'infection, le virus est stablement intégré, et soit compétent en termes de réplication mais transcriptionnellement ou post-transcriptionnellement silencieux, soit déficient [11]. Notons que les provirus défectifs ne permettent pas la production de nouvelles particules virales fonctionnelles mais en étant capable d'exprimer de l'ARNm viral et/ou des protéines virales, ils peuvent participer à la pathogenèse du VIH-1 [12]. Bien que le réservoir cellulaire s'établisse dès la primo-infection [13], l'estimation récente du réservoir latent total est d'environ 10<sup>8</sup> cellules

[14] dont seulement moins de 10 % de ces cellules infectées correspondraient à la fraction de provirus latents et compétents en termes de réplication [11]. La taille du réservoir est limitée mais se trouve dans un état pseudo-stable avec une virémie résiduelle persistante résultant de la réactivation virale et avec une mort cellulaire contrebalancée par l'expansion homéostatique de clones latents [15-17].

En plus du concept de réservoir cellulaire, il faut distinguer deux formes de latence virale en fonction de l'intégration ou non du génome viral dans le génome de la cellule hôte : la latence post-intégrationnelle et la latence pré-intégrationnelle [1].

La latence pré-intégrationnelle résulte d'un blocage partiel ou complet du cycle de réplication du virus lors des étapes précédant l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte. Ce blocage peut résulter, par exemple, d'une transcription inverse incomplète, de la présence d'un complexe de pré-intégration inefficace ou de la présence de facteurs de restriction dont APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*), une cytidine désaminase cellulaire qui induit une hypermutation de l'ADN viral dont l'action peut être empêchée par la protéine virale Vif (*viral infectivity factor*) [18]. L'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire est néanmoins possible suite à la levée de ces restrictions. Cette forme de latence est fréquemment observée dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les monocytes/macrophages, présentant un ratio d'ADNc VIH-1 non intégré *versus* intégré entre 10:1 et 100:1 [19, 20]. Les provirus non intégrés ne constituent pas une population homogène. Ceux-ci peuvent varier en termes de structure moléculaire, de stabilité, de profil d'expression et de leur rôle dans la latence. L'ADN viral non intégré peut se présenter sous une forme linéaire, une forme circulaire à un LTR (*long terminal repeat*) et une forme circulaire à deux LTR. Bien que logiquement, la forme linéaire soit la seule susceptible de s'intégrer dans l'ADN cellulaire, les formes circulaires à deux LTR peuvent s'auto-intégrer dans le génome cellulaire, conduisant à une infection active [21]. Les formes circulaires étant plus stables que la forme linéaire (seulement quelques jours), celles-ci pourraient donc également contribuer à la latence virale. De plus, non intégrées, elles pourraient servir de support pour la transcription virale. En effet, bien que le génome du VIH-1 ne se réplique pas de manière autonome, le virus non intégré peut exprimer une faible quantité de la protéine virale Nef (*negative factor*) [22, 23]. Non intégrées, les formes du virus ne se maintiennent pas dans les cellules se divisant rapidement telles que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés [23], limitant ainsi la contribution de la latence pré-intégrationnelle à la persistance virale du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Par contre, les monocytes/macrophages se

divisent lentement et présentent de nombreuses formes circulaires non intégrées, pouvant subsister jusqu'à deux mois. Bien que ces formes non intégrées soient encore susceptibles de s'intégrer dans le génome cellulaire lors de la levée de la restriction, la contribution de la latence pré-intégrationnelle à la persistance virale reste minoritaire. La latence post-intégrationnelle a lieu, quant à elle, lorsque l'expression d'un provirus intégré est bloquée après intégration dans le génome cellulaire. En effet, une fois intégré dans le génome hôte, l'expression des gènes viraux est sous le contrôle de la machinerie transcriptionnelle cellulaire afin de produire de nouveaux virions. La transcription est initiée au niveau du promoteur viral mais est déterminée par l'environnement et les facteurs cellulaires, et ce par les éléments *cis*-régulateurs présents principalement au niveau du LTR 5'. Par contre, l'élongation de la transcription est, elle, dépendante majoritairement de la quantité de la protéine virale trans-activatrice Tat (*transactivator of transcription*) en plus des facteurs de transcription cellulaires d'élongation. Un blocage de ces différents éléments au niveau transcriptionnel conduit à la latence post-intégrationnelle. Toutefois, elle peut également résulter d'un blocage au niveau post-transcriptionnel ou à une combinaison de ces deux-ci. Ce dernier est illustré par différents phénomènes comme la rétention de transcrits viraux dans le noyau suite à la régulation négative de l'export nucléaire, la modulation de la stabilité des ARN viraux par des mécanismes d'interférence de l'ARN ou encore par l'implication des modifications chimiques de l'ARN [24]. Bien que la latence post-intégrationnelle puisse être maintenue par des mécanismes agissant au niveau post-transcriptionnel, celle-ci apparaît bloquée au niveau transcriptionnel dans la majorité des cellules infectées de manière latente. Par conséquent, seuls les mécanismes impliqués dans le blocage transcriptionnel seront abordés dans cette revue. Notons dès à présent que la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes du VIH-1 et, par conséquent, de la latence virale résulte d'une interaction complexe et dynamique de multiples facteurs jouant au niveau de la phase d'initiation et d'élongation de la transcription.

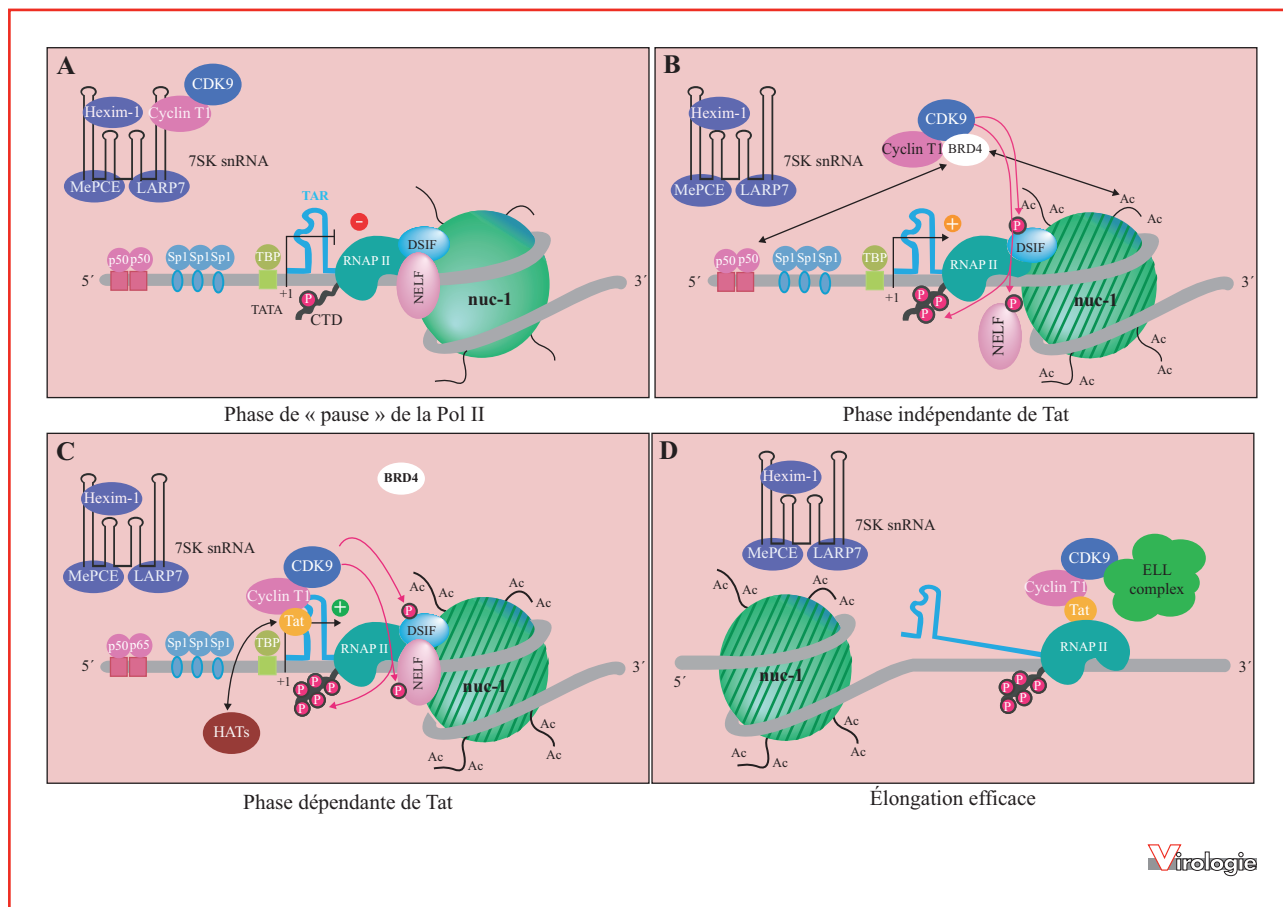
## Détaillons le processus de transcription du VIH-1

Pour détailler ce processus, commençons par l'organisation de la région comprenant le promoteur du VIH-1, le LTR 5' (*figure 1*). Le LTR 5' est composé de trois éléments structuraux : la région U3 (*unique* en 3', nucléotides [nt] -454 à +1), la région R (*repeat*, nt +1 à +98) et la région U5 (*unique* en 5', nt +98 à +184), où nt +1 correspond

au site d'initiation de la transcription. D'un point de vue fonctionnel, celui-ci se divise en quatre domaines : la région modulatrice, la région « *enhancer* », le promoteur basal et la région de démarrage (région « *leader* »). Cette dernière région est transcrite mais non traduite et les 59 premiers nucléotides transcrits correspondent à l'élément d'ARN TAR (*trans-activation response element*) qui adopte une structure secondaire stable en épingle à cheveux constituée d'une protubérance reconnue par la protéine virale trans-activatrice Tat ainsi que d'une boucle liant des facteurs cellulaires. Deux nucléosomes, nommés Nuc-0 et Nuc-1, sont présents au niveau du LTR 5' du VIH-1, leur positionnement est imposé par le virus, lui-même, et ce de manière indépendante du site d'intégration dans le génome cellulaire [25]. Ces quatre domaines fonctionnels présentent plusieurs sites de liaison pour divers facteurs de transcription cellulaires (*figure 1*, [25]) permettant une diversité d'expression virale dans le plus grand nombre d'environnements cellulaires différents. Cependant, malgré l'importance de ces éléments en *cis*, l'élongation de la transcription virale dépend majoritairement du trans-activateur viral Tat. La transcription du génome viral repose donc sur l'existence de deux phases : une phase précoce indépendante de Tat, où l'élongation est inefficace et une phase dépendante de la production de la protéine virale Tat, où l'élongation transcriptionnelle est hautement active [25].

Lors de la phase indépendante de Tat, le promoteur du VIH-1 est strictement sous le contrôle de l'environnement chromatinien et des facteurs de transcription cellulaires liant les éléments en *cis* dans la région promotrice (*figure 2A*). Lors de l'initiation de la transcription, le recrutement de la TBP (*TATA binding protein*) au niveau de la TATA box avec ou sans certains TAF (*TBP-associated factors*) permet la formation du complexe de pré-initiation spécifique au VIH contenant l'ARN polymérase II. La TATA box du VIH-1 ainsi que les régions directement adjacentes présentent une architecture unique et sont critiques pour la formation correcte et spécifique du complexe de pré-initiation (présence de TFIIA [*transcription factor II A*]) associé à la TBP) mais également pour la trans-activation par Tat. En condition de repos cellulaire, le promoteur du VIH est dépourvu du facteur TFIIH (*transcription factor II H*) et présente une accumulation d'ARN polymérase II hypophosphorylées. En plus de ce phénomène, des facteurs négatifs d'élongation (NELF [*negative elongation factor*] et DSIF [*DRB-sensitivity inducing factor*]) bloquent la progression de l'ARN polymérase II en phase précoce d'élongation ([26], *figure 2A*). Toutefois, des transcrits courts de  $\pm 60$  nt correspondant principalement à l'élément TAR sont générés. Un grand nombre d'ARN polymérase II sont alors « en pause » au niveau du promoteur viral proximal. Ce phénomène est fréquent chez les gènes eucaryotes inductibles et permet de rester en attente afin d'être prêt



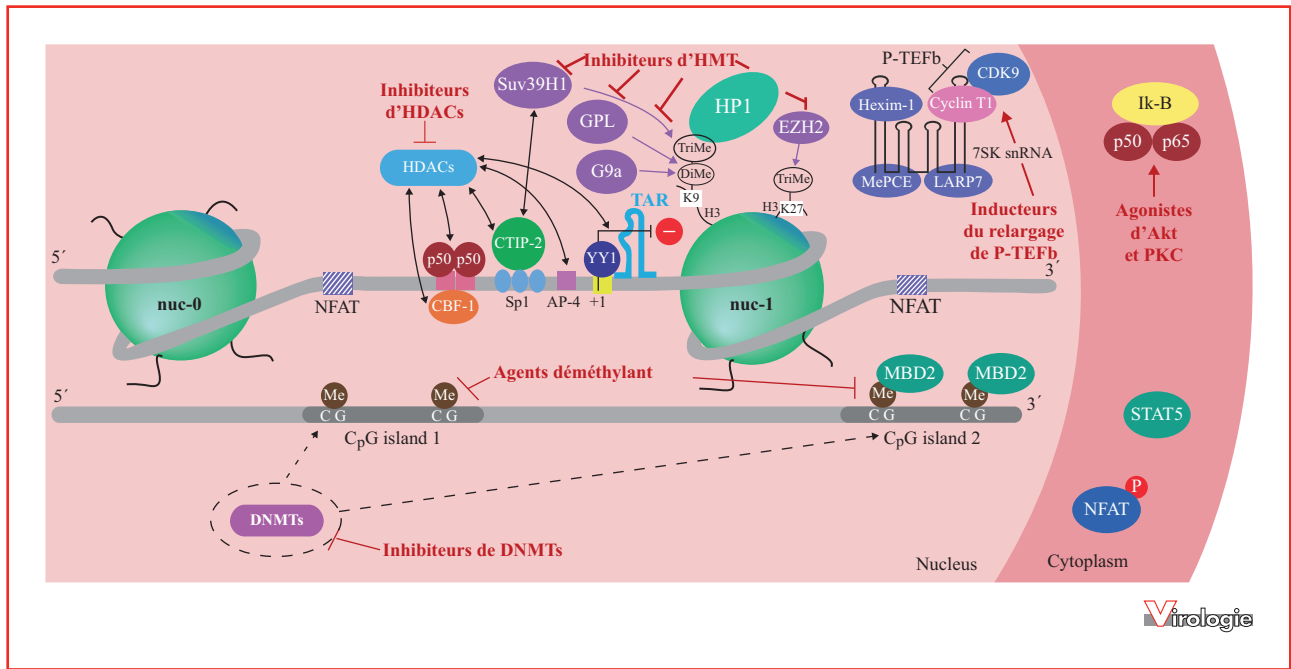


**Figure 2. Mécanisme transcriptionnel du VIH-1 (figure adaptée de [25]).** **A**) En absence de Tat, les facteurs négatifs d'élongation (DSIF et NELF) bloquent l'élongation de la transcription conduisant à la pause de l'ARN polymérase II (RNAP II) après l'initiation transcriptionnelle, ce qui résulte en l'accumulation de courts transcrits d'environ 60 nucléotides appelés TAR. **B**) Divers stimuli cellulaires peuvent entraîner le recrutement de p-TEFb (composé de Cdk9 et de la cycline T1) via le recrutement de Brd4 par l'acétylation des histones et de certains facteurs de transcription inducibles. La phosphorylation de la queue carboxy-terminale de l'ARN polymérase II par Cdk9 permet le début de la phase d'élongation, permettant la synthèse de quelques transcrits de taille complète et, par conséquent, la production des premières molécules de Tat. **C**) Une fois produit, Tat peut se lier au niveau de son élément de réponse TAR et interagir avec p-TEFb. En présence de Tat, l'activité kinase de Cdk9 est augmentée, de telle sorte que l'efficacité de l'ARN polymérase II est potentialisée. **D**) L'acétylation de Tat favorise la dissociation entre Tat et TAR, et le transfert de Tat vers l'ARN polymérase II. Traduite avec la permission de Springer Nature Customer Service Centre GmbH : Springer, Encyclopedia of AIDS, Transcription (Initiation, Regulation, Elongation) par Bouchat et al, © 2014.

placement des complexes non efficaces par de nouveaux complexes Tat/P-TEFb/ARN polymérase II efficace. Une boucle de rétrocontrôle positif de la transcription est ainsi mise en place et conduit à une transcription abondante [29]. De plus, Tat est capable de modifier la spécificité du substrat de Cdk9 en lui permettant également de phosphoryler les résidus sérines 5 du CTD, cible habituelle de la kinase Cdk7 (*cyclin-dependent kinase 7*) de TFIIH, ce qui potentialise l'activité d'élongation de l'ARN polymérase II. Tat recrute également des histones acétyltransférases (HAT) qui en modifiant le paysage chromatinien participent à la levée du blocage transcriptionnel. Les modifications post-traductionnelles de Tat contrôlent ses fonctions. Parmi elles,

l'acétylation de la lysine 50 de Tat favorise la dissociation entre Tat et TAR, et le transfert de Tat dans le complexe d'élongation de la transcription (ARN polymérase II sous sa forme phosphorylée) (figure 2D). Tat est ensuite dissocié du complexe d'élongation de la transcription lors de sa désacétylation par l'histone désacétylase sirtuine I (SIRT I) et est de cette façon recyclé.

En plus de son rôle classiquement reconnu dans l'induction de l'élongation transcriptionnelle efficace du VIH-1 et dans le remodelage de la chromatine du provirus, Tat peut également influencer l'initiation de la transcription du VIH-1 en facilitant l'assemblage du complexe de pré-initiation dépendant des sites de liaison Sp1 (*specificity protein 1*) et



**Figure 3. Mécanismes de la répression transcriptionnelle du VIH-1 (figure adaptée de [25]).** Lors de la latence, Nuc-1 bloque l'initiation et/ou l'élongation transcriptionnelle et est maintenu hypoacétylé par des HDAC recrutées au niveau du LTR 5' du VIH-1 par plusieurs (co)facteurs de transcription ou CTFP2. Des histones méthyltransférases (Suv39H1, G9a, GPL et EZH2) sont également recrutées et méthylent l'histone H3 au niveau des lysines 9 et 27. Le LTR 5' est hyperméthylé au niveau de deux îlots CpG, situés de part et d'autre du site d'initiation de la transcription, marque catalysée par les DNMT. Les facteurs essentiels à la transcription du VIH-1 sont maintenus sous leur forme inactive (dans le cytoplasme : NF-κB [hétérodimère p65/p50] par IκBα, la forme phosphorylée de NFAT et la forme non phosphorylée de STAT5 ; dans le noyau : le complexe P-TEFb inactif). Toutefois, ces éléments peuvent être théoriquement modulés pharmacologiquement comme indiqué en rouge. Traduite et adaptée avec la permission de Springer Nature Customer Service Centre GmbH : Springer, Encyclopedia of AIDS, Transcription (Initiation, Regulation, Elongation) par Bouchat et al, © 2014.

NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [30]. Deux études ont confirmé, par après, ce phénomène en mettant en évidence que Tat (VIH) et Tat (virus de l'immunodéficience simienne [VIS]) stimulent également l'expression des gènes VIH-1 et VIS, respectivement, indépendamment de la tige boucle TAR, et ce par les éléments de séquence Sp1 de la région U3 du promoteur [31, 32].

Un niveau suffisant de protéines virales trans-activatrices Tat est donc crucial pour une transcription virale efficace. Malgré la dépendance de Tat, P-TEFb fait partie des facteurs cellulaires jouant un rôle majeur dans la régulation transcriptionnelle du VIH-1. En plus de ces facteurs Tat et P-TEFb, la régulation transcriptionnelle dépend aussi du site d'intégration du provirus et du phénomène d'interférence transcriptionnelle ; de la présence ou absence au niveau du promoteur viral de certains facteurs de transcription cellulaires ; et de la structure de la chromatine du promoteur viral (notamment la présence du nucléosome répresseur Nuc-1, positionné juste en aval du site d'initiation de la transcription) et ses modifications épigénétiques (telles les modifica-

tions post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN). La transcription du VIH-1 est donc régulée par des mécanismes épigénétiques et non épigénétiques impliquant aussi bien des facteurs cellulaires que des facteurs viraux. Plusieurs de ces éléments ont été étudiés et mis en évidence, et ce principalement dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, comme impliqués dans l'établissement et le maintien de la latence post-intégrationnelle du VIH-1 (figure 3, [1]).

### Décortiquons un à un les mécanismes moléculaires impliqués dans la latence post-intégrationnelle du VIH-1

#### Le rôle des facteurs de transcription cellulaires

Le LTR 5' du VIH-1 présente de nombreux sites de liaison (> 50) pour des facteurs de transcription positifs et négatifs [1, 29], montrant une régulation fine de la transcription virale qui dépend de la disponibilité en facteurs cellulaires positifs et/ou négatifs. Ce concept est illustré lorsque des

mutations aléatoires du promoteur du VIH-1 aboutissent à une diversité d'effets positifs et négatifs sur la réplication virale [33]. Dans ce contexte, les sites de liaison prédits ou mis en évidence *in vitro* reprennent la liaison potentielle de facteurs de transcription cellulaires exprimés ubiquitairement (ex. : Sp1, TFIID) ou de manière inductible (ex. : NFAT [*nuclear factor of activated T cell*], NF- $\kappa$ B).

Parmi les nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription, seulement une fraction restreinte semble être critique pour la transcription basale du VIH-1 *in vivo*. Celle-ci inclut les facteurs NF- $\kappa$ B, NFAT, Sp1 et TBP. Ces facteurs enclenchent la machinerie basale pour former le complexe de pré-initiation de la transcription. Les autres facteurs liant le LTR 5' ont une fonction de régulation coopérative positive ou négative ou de modulation de l'activité du promoteur en réponse à différents stimuli cellulaires, permettant de déterminer le degré approprié de réactivation, et ce allant d'une inhibition complète à une expression élevée de la transcription.

Dans le contexte des cellules T au repos, l'environnement cellulaire n'est pas optimal pour la transcription du VIH-1 étant donné que les deux facteurs de transcription positifs cruciaux dans le cadre de la transcription virale, NF- $\kappa$ B (p50/p65) et NFAT, sont séquestrés dans le cytoplasme. Ce phénomène contribue à la latence post-intégrationnelle, étant donné que, lors de l'activation cellulaire, ceux-ci migrent vers le noyau afin de remplir leur rôle et, dans le cas d'une cellule infectée par VIH-1, d'activer la transcription virale.

En fonction du contexte cellulaire et en réponse aux voies de signalisation cellulaires différentielles, le niveau de réactivation peut être modulé. Par exemple, sous l'activation des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), les facteurs de transcription c-Jun et c-Fos sont induits et interagissent physiquement avec NF- $\kappa$ B pour augmenter de manière synergique l'activation du promoteur viral initié par NF- $\kappa$ B [34]. Au contraire, la protéine HspBP1 (*Hsp70-binding protein 1*) peut être recrutée au niveau des sites de liaison NF- $\kappa$ B et rentrer en compétition avec NF- $\kappa$ B pour la liaison à l'ADN, conduisant à une diminution, voire une suppression, de la transcription virale induite par NF- $\kappa$ B [35].

En plus de la coopération entre les facteurs de transcription, le niveau de la protéine virale Tat peut également influencer l'effet activateur ou répresseur sur la transcription virale de certains de ces facteurs [36], tels c-Jun qui, en absence de Tat, réprime l'activité promotrice du VIH-1.

Pris ensemble, nous concluons que la présence/absence de certains facteurs de transcription cellulaires reflétant le contexte cellulaire et la combinaison de ceux-ci déterminent le niveau d'expression basale, constituant le premier niveau de modulation de la latence post-intégrationnelle.

### *La régulation transcriptionnelle du VIH-1 par la protéine trans-activatrice Tat et ses coactivateurs/corépresseurs cellulaires*

Comme décrit ci-dessus, la protéine virale trans-activatrice Tat joue un rôle majeur dans la régulation transcriptionnelle du VIH-1 et, par conséquent, dans la latence virale. L'expression des gènes du VIH-1 est, en effet, caractérisée par une phase précoce indépendante de Tat, où l'élongation est inefficace, et une phase tardive dépendante de Tat, où l'élongation est efficace [25]. Toutefois, l'état de latence du VIH-1 peut aussi être établi lorsque l'expression de Tat est réduite à un niveau sous-optimal ou lorsque son activité est inhibée. Notamment, l'ARN long non codant NRON, présent en quantités importantes dans les cellules T CD4<sup>+</sup> au repos, induit la latence en dirigeant Tat vers une dégradation par le protéasome [37]. De plus, les modifications post-traductionnelles de Tat influencent son activité et déterminent la liaison de ses partenaires activateurs et/ou répresseurs dont les plus critiques sont P-TEFb et TAR [29].

La régulation de l'activité de Tat de manière indirecte résulte d'une multitude de mécanismes impliquant de nombreux facteurs cellulaires. En plus du complexe SEC, la transcription dépendante de Tat est accompagnée du recrutement de nombreux coactivateurs transcriptionnels et de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine afin de promouvoir une forte transcription du VIH-1. À l'opposé, afin de favoriser un état latent, des corépresseurs peuvent être recrutés. Par exemple, le facteur cellulaire CTIP2 (*chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2*) est capable, dans certains cas, de réprimer la trans-activation par Tat dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par son recrutement au niveau du promoteur du VIH-1 en s'associant avec le complexe de remodelage de la chromatine NurD [38]. De même, dans les cellules microgliales, CTIP2 est capable de relocaliser Tat dans des régions transcriptionnellement inactives de la chromatine par la protéine HP1 (*heterochromatin protein 1*) [39]. La protéine HIC-1 (*HIC ZBTB transcriptional repressor 1*) est un répresseur de la trans-activation par Tat dans les cellules microgliales [40]. La présence de protéines chaperones des histones, telles l'hétérodimère SUPT16H-SSRP1, peut également diminuer l'interaction entre Tat et la cycline T1 [41].

En plus du facteur viral Tat, une élongation efficace de la transcription nécessite l'action de P-TEFb. Cependant, *in vivo*, l'activité de P-TEFb dépend de l'équilibre entre la formation de complexes P-TEFb actifs et de complexes P-TEFb inactifs. Cet équilibre étant dynamique et modulable physiologiquement, P-TEFb est directement impliqué dans les mécanismes de répression de la transcription virale et, par conséquent, de la latence post-intégrationnelle. Le complexe inactif de P-TEFb résulte de l'association de P-

TEFb avec le petit ARN nucléaire 7SK (7SK snRNA) dont l'intégrité est maintenue par MePCE (*7SK-specific methyl-phosphate-capping enzyme*) et LARP7 (*La-related protein 7*), et permet le recrutement d'HEXIM1 (*HMBA inducible protein 1*). Cette association conduit à l'inhibition de sa sous-unité catalytique Cdk9. Le complexe actif, quant à lui, résulte de son association avec Brd4 (*bromodomain-containing protein 4*), un régulateur positif de l'activité de P-TEFb. Brd4 est une protéine membre de la famille des protéines BET (*bromodomain and extraterminal*) possédant deux bromodomains qui reconnaissent les histones acétylées ainsi que le facteur cellulaire NF- $\kappa$ B acétylé. La génération des premières molécules de Tat résulte de rares cas d'élongation transcriptionnelle par le recrutement au niveau du promoteur du VIH de P-TEFb par Brd4 (*figure 2B*). Toutefois, lorsque la protéine virale Tat est produite, celle-ci entre directement en compétition avec HEXIM1 pour la liaison de la cycline T1 conduisant au relargage de P-TEFb de son complexe inactif et au recrutement de celui-ci au niveau du promoteur du VIH par la formation du complexe Tat-SEC. Dans ce contexte, le complexe actif P-TEFb-Brd4, requis pour l'élongation de la transcription des gènes cellulaires, devient un inhibiteur potentiel de la trans-activation par Tat et la levée de la latence virale, dû à la compétition de Brd4 avec Tat pour la liaison de P-TEFb [29]. Des inhibiteurs de Brd4 ont confirmé ce phénomène en permettant la réactivation de virus latent [1].

En plus des membres classiquement connus du complexe P-TEFb inactif, CTIP2 peut également y être associé [42]. Dans ce cas, CTIP2 réprime l'activité kinase de Cdk9, contribuant à l'inactivation de P-TEFb. De manière intéressante, le recrutement de complexes Tat/P-TEFb inactifs au niveau du promoteur du VIH-1 a été mis en évidence [43] et, plus récemment, un modèle propose que la protéine chromatinienne non histone HMGA1 (*high mobility group AT-hook 1*), connue pour lier également l'ARN 7SK [44] et importante pour la fonction répressive de CTIP2, favorise le recrutement de P-TEFb inactivé par CTIP2 au niveau du promoteur du VIH-1 [45]. En effet, HMGA1, en plus d'interagir avec de nombreux facteurs de transcription [46], possède plusieurs sites de liaison dans le LTR 5' du VIH-1 [47] et est également capable de se lier à la tige boucle d'ARN de TAR, facilitant la latence virale [48]. Dans le même contexte de recrutement mais dans le but de promouvoir la transcription, la protéine KAP1 (*kinesin-associated protein 1*) est capable d'interagir directement avec LARP7 pour pré-charger le complexe P-TEFb inactif sur la région proximale du promoteur, et ce de manière indépendante de Tat [49]. Bien que ce phénomène soit indépendant de Tat, le pré-chargement par KAP1 du complexe P-TEFb inactif pourrait faciliter le recrutement de P-TEFb par Tat afin d'initier l'élongation de la transcription et donc

de faciliter lors d'une stimulation, une transition rapide de l'ARN polymérase II « en pause » vers une élongation hautement active de la transcription. Un troisième mécanisme propose le recrutement de Tat par le complexe P-TEFb inactif au niveau du promoteur viral indépendamment de la tige boucle TAR, et ce par l'intermédiaire du facteur de transcription ZASC1 (*zinc finger protein 639*) [50]. Bien que ZASC1 ne présente pas d'effet sur la transcription basale du VIH-1, le recrutement du complexe Tat/P-TEFb/7SK par celui-ci favorise l'élongation de la transcription dans les lignées cellulaires et dans les cellules primaires [50]. Les protéines CTIP2/HMGA1, ZASC1 et KAP1 permettent toutes le recrutement du complexe P-TEFb inactif au niveau du promoteur viral. Cependant, leurs recrutements ont des finalités opposées. CTIP2/HMGA1 recrute P-TEFb inactif pour induire la latence virale et ZASC1 et KAP1 pour favoriser une transcription plus rapide. Ceci questionnant la nécessité de spécificité cellulaire, de redondance ou de mécanismes alternatifs.

En plus de l'association de complexes spécifiques, dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos, la répression de l'activité de P-TEFb est également due à des mécanismes post-transcriptionnels et post-traductionnels spécifiques à l'hôte [51]. Notamment, l'expression de la cycline T1 peut être restreinte par un microARN et Cdk9 peut être inactivée par déphosphorylation au niveau de sa boucle d'activation régulatrice. Dans ce cadre, une étude récente a mis en évidence qu'une inhibition de la voie de signalisation mTOR (*mechanistic target of rapamycin kinase*) conduirait à une diminution générale de la phosphorylation de Cdk9, impactant la trans-activation médiée par Tat et la levée de la latence du VIH-1 [52].

Ces résultats illustrent le contrôle complexe par Tat et P-TEFb de l'élongation de la transcription du VIH-1 et leur contribution cruciale dans la latence virale.

### Le site d'intégration

L'intégration du génome du VIH-1 dans le génome de la cellule hôte est une étape essentielle pour la réplication virale mais aussi un pré-requis pour l'établissement de la latence à long terme. En effet, le VIH-1 s'intègre dans le génome de la cellule hôte de manière non aléatoire [53]. La sélection du site d'intégration du VIH-1 est un processus à plusieurs étapes dépendant de plusieurs éléments [53]. Plusieurs facteurs cellulaires sont impliqués dans la détermination de l'efficacité et la sélection du site d'intégration. La plupart font partie du complexe de pré-intégration tels que LEDGF/p75 (*lens epithelium-derived growth factor/p75*), HMGA1 et BAF. L'intégrase virale, en collaboration avec le facteur cellulaire LEDGF/p75, cible le complexe de pré-intégration vers les régions introoniques de gènes activement transcrits [54]. Bien qu'aucune



séquence consensus spécifique n'ait été identifiée, la présence de séquences palindromiques dans la séquence de l'hôte constituerait des localisations préférentielles [55]. Un environnement chromatinien typique des gènes activement transcrits tel que la marque H3K36me3 chevauche avec le profil des sites d'intégration du VIH-1 [56]. En plus des régions euchromatiniennes, l'intégration du VIH-1 se passerait de manière préférentielle à la périphérie nucléaire et dans les gènes associés avec les complexes des pores nucléaires, la topologie nucléaire jouant un rôle critique dans le contrôle de l'expression des gènes viraux [53].

La distribution des sites d'intégration du VIH-1 est néanmoins hautement variable dans les cellules primaires de patients avirémiques [57]. Toutefois, des études cartographiant les sites d'intégration du VIH-1 dans des cellules T CD4<sup>+</sup> de patients sous traitement cART avirémiques depuis longtemps ont mis en évidence des sites d'intégration identiques dans plusieurs cellules, suggérant une expansion clonale de la cellule initialement infectée [15, 16]. Cette découverte est cohérente avec un mécanisme par lequel la persistance et la prolifération des cellules infectées de manière latente se produit comme une conséquence de l'intégration virale dans les gènes associés au cancer [15, 16].

Suite à l'intégration, LEDGF/p75 est présumé comme un facteur de répression de la transcription du VIH-1 et de la latence virale par le recrutement de répresseurs chromatinien [58], suggérant un lien entre l'intégration et la répression du VIH-1. En plus d'une répression directe, l'expression des gènes viraux peut être affectée par sa position et/ou son orientation par rapport aux promoteurs des gènes cellulaires voisins constituant le phénomène d'interférence transcriptionnelle. Un phénomène d'encombrement stérique peut se produire lorsque le provirus s'intègre dans la même orientation transcriptionnelle que le gène hôte. Le passage de l'ARN polymérase II pourrait de cette façon déplacer les facteurs de transcription critiques à l'activité transcriptionnelle du VIH-1, ce qui empêcherait l'assemblage du complexe de pré-initiation sur le promoteur viral, entravant sa transcription. Un phénomène d'occlusion de promoteur peut également se produire lorsque le provirus s'intègre dans le sens opposé du gène hôte, menant à la collision des ARN polymérases lors de l'élongation et à une terminaison prématurée de la transcription à partir des deux promoteurs. Enfin, une interférence transcriptionnelle peut également avoir lieu lorsque l'« enhancer » d'un gène, celui du VIH-1 par exemple, est détourné et utilisé par le promoteur d'un second gène, un gène cellulaire par exemple. Ces différents types d'interférence transcriptionnelle peuvent impacter la transcription virale négativement.

Toutefois, la transcription des gènes ne prend pas place sur une chromatine linéaire mais dans un environnement 3D dans lequel le provirus VIH-1 actif forme des boucles chromatinien permettant une interaction directe entre le LTR 5' et le LTR 3' par l'interaction entre TFIIIB sur le LTR 5' et Ssu72 (*RNA polymerase II CTD phosphatase*) lié au niveau du LTR 3' [59]. Cette boucle est formée lors de l'initiation et de l'élongation de la transcription virale et est consolidée par le recrutement de Tat sur TAR [59]. Cette boucle facilite le recyclage de l'ARN polymérase II et la ré-initiation transcriptionnelle, supprimant une transcription potentiellement divergente ou stochastique. La formation de boucle au niveau du VIH-1 pourrait induire la relocalisation du provirus au niveau des pores nucléaires lesquels favoriseraient la stabilité et la transcription virale [60]. Le provirus VIH-1 étant capable d'établir des boucles d'interaction entre ses deux LTR, des séquences « enhancer » endogènes pourraient également être détournées par le VIH-1 et moduler l'expression virale.

#### *La structure chromatinienne du provirus VIH-1*

Le provirus VIH-1 étant intégré dans le génome cellulaire, son expression génique est également contrôlée par la structure chromatinienne locale. L'établissement d'une structure chromatinienne répressive au niveau du promoteur du VIH-1 est un des obstacles majeurs à une transcription virale efficace. La structure de la chromatine est contrôlée par des modifications épigénétiques, qui se définissent comme étant des changements héréditaires dans la fonction des gènes qui ne sont pas causés par une altération de la séquence ADN.

#### **La structure de la chromatine**

L'unité structurale et fonctionnelle de la chromatine est le nucléosome. La condensation de la chromatine détermine l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription. L'état de condensation de la chromatine peut être modulé par une variété de mécanismes, incluant les modifications post-traductionnelles des queues N-terminales des histones et la méthylation de l'ADN. Ces modifications épigénétiques agissent soit directement en altérant les interactions entre les histones et l'ADN, soit indirectement en recrutant des enzymes capables de modifier la structure de la chromatine. En plus de ceux-ci, les complexes de remodelage chromatinien ATP (adénosine triphosphate) dépendants couplent l'hydrolyse de l'ATP à des changements structuraux dans le nucléosome.

Notre laboratoire a précédemment mis en évidence la présence de deux nucléosomes, Nuc-0 et Nuc-1, localisés dans la région du LTR 5' du VIH-1 [61-63] et montré que leur positionnement est imposé par le virus, et ce de manière indépendante du site d'intégration dans le génome cellulaire. Nuc-1, situé immédiatement en aval du site

d'initiation de la transcription, empêche la liaison de certains facteurs de transcription cellulaires et contribue au blocage transcriptionnel observé dans les cellules infectées de manière latente. Cependant, le promoteur latent peut être réactivé suite à de nombreux stimuli incluant des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 [interleukine 6], TNF- $\alpha$  [*tumor necrosis factor*  $\alpha$ ]), des anticorps (anti-CD3), des esters de phorbols (PMA [*phorbol-12-myristate-13-acetate*], prostatine) et la protéine virale Tat [61]. Dans ce cadre, le nucléosome Nuc-1 est spécifiquement remodelé suite à l'activation transcriptionnelle de l'expression virale [64]. Ces résultats indiquent que la chromatine fait partie intégrante de la machinerie de régulation transcriptionnelle du VIH-1 puisqu'une perturbation structurale de la chromatine est associée à l'activation de l'expression des gènes.

### Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant

Le positionnement spécifique de Nuc-1 est un phénomène intéressant. Qui plus est, le score de liaison des histones, qui permet de prédire l'affinité de la formation des nucléosomes sur une séquence d'ADN, est faible dans cette région. Logiquement, ce nucléosome devrait se former en amont, au niveau du premier site hypersensible aux nucléases (DHS1) [65]. Bien qu'originellement le positionnement des nucléosomes sur le promoteur du VIH-1 semblait passif, Rafati *et al.* ont montré que le complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant SWI/SNF/BAF utilisait l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour positionner Nuc-1 au niveau de la région d'ADN présentant un environnement thermodynamique suboptimal comparé au site DHS1 [65]. Le membre BAF permettrait le positionnement de ce nucléosome répressif et jouerait un rôle dans l'inhibition de la transcription, étant donné que lors de l'inhibition de celui-ci par la *down*-régulation de sa sous-unité BAF250 ou lors de l'utilisation d'inhibiteurs de BAF, une activation du VIH-1 latent peut être observée [65, 66]. Notons que lorsque ce complexe comprenant PBAF à la place de BAF est recruté par Tat acétylé, il favorise une transcription efficace [67].

D'autres complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant jouent un rôle dans le maintien d'un état chromatinién répressif au niveau du LTR 5' du VIH-1 conduisant à une répression de la transcription, tels que CHD1 (*chromodomain helicase DNA binding protein 1*) [68, 69] et NuRD [70].

Les complexes de remodelage de la chromatine ne sont pas seulement cruciaux pour la régulation de la transcription basale du VIH-1 mais jouent également un rôle pivot dans le remodelage actif des nucléosomes lors de la trans-activation par Tat [71].

### Les modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications des queues N-terminales des histones, catalysées par des enzymes spécifiques, sont réversibles et incluent notamment l'acétylation et la méthylation. Ces modifications covalentes influencent l'expression des gènes selon deux mécanismes. Le premier consiste en une altération directe du compactage de la chromatine par des modifications au niveau des charges électrostatiques ou au niveau du contact entre les nucléosomes, impliquant une augmentation ou une réduction de l'accès de la chromatine aux facteurs de transcription. Le second mécanisme s'explique par la génération de nouvelles interactions avec des protéines associées à la chromatine. Par exemple, les lysines acétylées sont reconnues par des protéines possédant un bromodomaine et les lysines méthylées sont reconnues par des protéines arborant un chromodomaine. Ces modifications fonctionnent de façon séquentielle ou en combinaison.

#### L'acétylation des histones

Deux types d'enzymes permettent d'influencer le niveau d'acétylation des lysines des histones et, par conséquent, la transcription : les HAT et les histones désacétylases (HDAC). La réaction d'acétylation, catalysée par les HAT, consiste en un transfert d'un groupement acétyle de l'acétyl coenzyme A sur le groupement  $\epsilon$ -amino de la lysine, abolissant la charge positive portée par celle-ci. Les interactions électrostatiques entre les queues N-terminales des histones et le squelette phosphodiester de l'ADN sont, par conséquent, diminuées et l'ADN est alors plus accessible aux facteurs de transcription. Une hyperacétylation des queues N-terminales des histones est donc généralement associée à une transcription active. Par contre, une désacétylation des histones est plutôt associée à une répression transcriptionnelle et à la formation d'hétérochromatine.

Notre laboratoire a précédemment mis en évidence que le nucléosome Nuc-1 est remodelé suite au traitement des cellules par des inhibiteurs de HDAC, et que ce phénomène s'accompagne d'une hyperacétylation des histones au niveau du LTR 5' permettant l'activation de l'expression virale [62]. Le fait que l'inhibition des HDAC soit suffisante pour l'activation transcriptionnelle suggère que Nuc-1 est maintenu hypoacétylé par des HDAC dans la région promotrice du VIH-1. En effet, en condition de latence, plusieurs facteurs capables de se lier dans la région « enhancer » et promotrice du LTR 5' libre de nucléosomes peuvent recruter HDAC1 (dont le dimère inactif p50/p50 de NF- $\kappa$ B et Sp1 par l'intermédiaire de CTIP2) [61, 72]. De plus, en condition d'activation, des HAT (dont p300/CBP [*sarcoplasmic calcium-binding protein*], p/CAF et Gcn5) sont recrutées dans la région de Nuc-1, notamment par le dimère actif p50/p65 de NF- $\kappa$ B et par la protéine virale

Tat [73]. De manière intéressante, la protéine virale accessoire Vpr (*viral protein r*) a récemment été trouvée comme impliquée indirectement dans la levée de la latence par l'induction de la dégradation d'HDAC3 et HDAC1 au niveau du promoteur viral [74].

### La méthylation des histones

La méthylation des histones est catalysée par des histones méthyltransférases (HMT) classées en deux groupes selon le résidu ciblé : les histones lysines méthyltransférases (HKMT) et les protéines arginines méthyltransférases (PRMT) [75]. Ces enzymes catalysent le transfert d'un, deux ou trois groupements méthyle du cofacteur S-adenosyl-L-méthionine (AdoMet ou SAM) vers un résidu lysine ou arginine, respectivement, de la queue N-terminale des histones. Il existe deux familles d'histones déméthylases, qui catalysent la réaction opposée : la famille de LSD1 (*lysine specific demethylase 1*) et la famille Jumonji. La méthylation des histones peut avoir un effet activateur ou répresseur sur la transcription des gènes en fonction de sa nature (mono-, di- ou triméthylation) et de la position du résidu méthylé. Elle n'affecte pas les interactions ADN/histones mais les régions méthylées servent de modèle de reconnaissance pour des protéines effectrices modifiant l'environnement chromatinien.

Dans le cadre du VIH-1, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) est impliquée dans la répression chromatinienne de l'expression du VIH-1 [76, 77]. Les HMT catalysant la di- et la triméthylation d'H3K9, G9a [77] et Suv39H1 (*suppressor of variegation 3-9 homolog 1*) [76, 78] respectivement sont impliquées dans l'établissement de la latence du VIH-1. En effet, Suv39H1, la triméthylation d'H3K9 (H3K9me3) et la protéine d'hétérochromatine HP1 $\gamma$  jouent un rôle majeur dans la répression de l'expression du virus dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et les cellules mononucléées de sang périphérique (PBMC) [76]. En outre, l'HMT Suv39H1 intervient dans un modèle d'établissement de la latence dans les cellules microgliales (macrophages résidant du système nerveux central) [78]. Ce modèle implique le recrutement du corépresseur CTIP2 au niveau des facteurs de transcription Sp1 liés sur ses trois sites de liaison au niveau de la région U3 du LTR 5' du VIH-1. CTIP2 recrute ensuite les histones désacétylases HDAC1 et HDAC2, qui désacétylent H3K9, pré-requis nécessaire à la triméthylation d'H3K9, puis recrute Suv39H1, qui triméthyle H3K9. Cette dernière modification favorise le recrutement de la protéine HP1 $\gamma$  et, par conséquent, la mise en place d'un environnement hétérochromatinien dans la région promotrice du virus. De plus, bien que la lysine déméthylase LSD1 joue le rôle d'un coactivateur de la transcription du VIH-1 dans les cellules T infectées par la déméthylation de Tat [79], celle-ci, en coopérant avec CTIP2, réprime

la transcription virale dans les cellules microgliales par son association avec les marques H3K4me3 et H3K9me3 [80]. L'observation de niveaux anormalement hauts des protéines CTIP2, HP1, MePC2 et HDAC2 dans des tissus cérébraux *post-mortem* de patients VIH<sup>+</sup> renforce ce modèle centré sur CTIP2 [81]. Suv39H1 est également impliqué dans la répression transcriptionnelle du VIH-1 dans les astrocytes (le type cellulaire le plus abondant du cerveau) [82].

La diméthylation d'H3K9 (H3K9me2) catalysée par G9a peut également recruter HP1 $\gamma$  et donc participer au maintien de la latence virale [77]. Une autre HMT, GLP pour *G9a-like-protein*, joue également un rôle important dans le maintien de la latence du VIH-1 par la mise en place d'H3K9me2 [83].

L'HMT EZH2 (*enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*), sous-unité du complexe répressif polycomb PRC2 responsable de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), est aussi présente au niveau du promoteur du VIH-1 latent et rapidement déplacée suivant l'activation des cellules T [84]. En absence d'EZH2, la fréquence des cellules, dans lesquelles la transcription du VIH-1 est immédiatement réprimée, est diminuée [85]. De même, un traitement par un inhibiteur spécifique de PRC2, empêche l'établissement de la latence du VIH-1 dans des cellules ayant subi initialement une infection productive [85]. À l'opposé, lors de la transactivation par Tat, les niveaux d'expression de la lysine déméthylase UTX sont augmentés conduisant à une diminution du niveau d'H3K27me3 au niveau du LTR du VIH-1 [86].

De manière intéressante, un entrecroisement des voies de méthylation H3K9 et H3K27 augmente la complexité potentielle de la régulation de la latence du VIH-1 par ce mécanisme. En effet, une population de cellules infectées transcriptionnellement actives est d'abord réprimée par une augmentation du dépôt de la marque H3K27me3 et ensuite suivie par la marque H3K9me3 [85]. Dans ce cadre, ce type de population semble plus difficile à réactiver suggérant que la cinétique de la mise en place des mécanismes impliqués dans l'établissement de la latence du VIH-1 impacte directement la levée de la latence virale.

### La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une modification chimique post-répllicative, réversible et héréditaire. Celle-ci résulte du transfert d'un groupement méthyle du cofacteur SAM vers le carbone en position 5 d'un résidu cytosine localisé au sein de dinucléotides CpG. Cette réaction est catalysée par les ADN méthyltransférases (DNMT) qui, chez les mammifères, sont divisées en trois familles sur base de leurs homologies de séquence : DNMT1, DNMT2 et

DNMT3 (comprenant les membres DNMT3a, DNMT3b et DNMT3l). Dans le génome humain, 60 à 80 % des CpG sont méthylés, principalement au niveau de séquences répétées telles les transposons ou l'ADN ribosomal. La distribution des CpG dans le génome des mammifères est inégale et non aléatoire, se concentrant au niveau de courtes régions génomiques de haute densité en CpG nommé îlot CpG. Typiquement, les îlots CpG se retrouvent dans les promoteurs des gènes constitutivement exprimés où ils sont hypométhylés et servent de sites d'initiation de la transcription. Toutefois, certains de ces îlots CpG peuvent être méthylés, ce qui entretient un état transcriptionnellement inactif.

La méthylation de l'ADN interfère avec la transcription soit de manière directe par encombrement stérique empêchant la liaison de facteurs de transcription à leurs sites de liaison soit de manière indirecte par la liaison des protéines capables de lier les CpG méthylés, lesquelles à leur tour interagissent avec des enzymes de modification de la chromatine, conduisant à une structure hétérochromatinienne. Les protéines liant les CpG méthylés sont divisées en trois familles chez les mammifères : les protéines à domaine de liaison au méthyl (MBD), les protéines Kaiso et similaires à Kaiso, et les protéines à domaine SRA (*SET and RING associated*).

Concernant le processus inverse, une déméthylation passive peut avoir lieu par l'inhibition de l'expression ou de l'activité des DNMT. Concernant la déméthylation active, aucune déméthylase de l'ADN n'a été caractérisée à ce jour. Cependant, l'hydroxyméthylation des cytosines pourrait être à la base d'un mécanisme indirect de déméthylation active couplé à la réparation de l'ADN par excision de base. En effet, les cytosines méthylées peuvent être converties en cytosines hydroxyméthylées par les enzymes TET (*TET active translocation*). L'hydroxyméthylation des cytosines est toutefois corrélée à une répression transcriptionnelle [87]. Cependant, les cytosines hydroxyméthylées peuvent être déaminées en 5-hydroxyméthyluracils par les cytidines déaminases de la famille AID (*activation-induced cytidine deaminase*)/APOBEC [88], conduisant à leur reconnaissance par la machinerie d'excision/réparation de base. Celles-ci sont alors excisées et remplacées par des cytosines [89].

Lors d'une infection virale, la méthylation de l'ADN peut maintenir une répression transcriptionnelle conduisant à une latence virale. L'implication de la méthylation de l'ADN dans la latence du VIH-1 a montré que deux îlots CpG, situés de part et d'autre du site d'initiation de la transcription du promoteur VIH-1 sont hyperméthylés dans des cellules T-lymphoïdes primaires et dans la lignée cellulaire T-lymphoïde J-Lat, toutes deux infectées de manière latente [70]. De plus, Le niveau de méthylation des îlots CpG du promoteur du VIH-1 contribue à verrouiller l'état silen-

cieux du provirus en association avec des modifications répressives des histones [90], influençant ainsi le niveau de résistance du VIH-1 à la réactivation.

Cependant, le degré de méthylation de l'ADN au niveau du LTR 5' dans les cellules *ex vivo* de patients VIH<sup>+</sup> est resté controversé [11, 90-93] jusqu'en 2016 [94]. En effet, deux études présentaient, d'une part, une hyperméthylation des îlots CpG au niveau du LTR 5' du VIH dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoire au repos provenant de patients avirémiques sous traitement [90] et, d'autre part, une méthylation non significative dans le même type de population cellulaire de patients VIH<sup>+</sup> [91]. Toutefois, dans des cellules T CD4<sup>+</sup> au repos résistantes à la réactivation préférentiellement méthylées au niveau du LTR 5' [90], une hypométhylation du LTR 5' a malgré tout été observée [11]. Dans une population de PBMC totaux, une hypométhylation chez des patients non traités avirémiques appartenant aux groupes des élites controllers (EC) et des *long-term non-progressors* (LTNP) [92] est également observée. Le profil de méthylation du LTR 5' pouvant cependant varier au cours du temps [93].

Les sources majeures des différences entre les études proviennent entre autres de la variabilité des caractéristiques cliniques des patients étudiés et des différents types cellulaires analysés. Notamment, la durée du traitement du patient était entre quatre et 17 ans pour une étude [90] et entre 0,9 à 6,6 ans pour l'autre [91]. En effet, en lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, il existe une corrélation positive entre la durée de traitement des patients et l'état de méthylation du LTR 5' du VIH-1. Une accumulation de la méthylation de l'ADN au niveau du LTR 5' étant observée chez les patients suivant le traitement cART depuis plus de trois ans [94].

D'autres critères doivent toutefois être impliqués dans cette variation du profil de méthylation du promoteur du VIH-1 *ex vivo*. En plus de cela, la controverse réside probablement en partie dans le manque de connaissances des mécanismes moléculaires associés à la méthylation de l'ADN. En effet, les mécanismes menant à la méthylation et/ou déméthylation de l'ADN au niveau du promoteur du VIH-1 ne sont pas complètement connus à ce jour. Dans le cadre de l'établissement de la méthylation, Trejbalova *et al.* ont montré qu'une accumulation de la méthylation pouvait être observée suite à plusieurs cycles de réactivation [94]. Toutefois, le recrutement des enzymes catalysant la méthylation de l'ADN, les DNMT, au niveau du LTR 5' du VIH-1 n'a jamais été démontré. Seule l'implication de DNMT1, à l'opposé de DNMT3b, a été mise en évidence dans le maintien du statut de méthylation du promoteur viral dans des lignées infectées par un minivirus [94]. DNMT2, méthylase de l'ARN, quant à elle, est capable de relocaliser l'ARN viral du noyau vers des granules de stress et de le méthyler, participant à la stabilité post-transcriptionnelle de l'ARN du VIH-1 [95]. De plus, l'implication de la méthylation de

l'ADN dans l'inhibition de la transcription du VIH-1 n'a été que peu étudiée. En 1990, les données de Bednarik *et al.* ont suggéré que l'hyperméthylation du LTR 5' du VIH-1 pouvait changer les caractéristiques de liaison de certaines protéines pour la séquence du LTR 5', conduisant à la suppression de la transcription du LTR 5' et à la modulation de l'expression viral [96]. Dans ce cadre, Kauder *et al.* ont rapporté que le deuxième îlot CpG du LTR 5' permettait le recrutement de MBD2 en condition hyperméthylé et qu'un traitement par un agent déméthylant, la 5dC, conduisait à une réactivation virale en lignées infectées de manière latente et en cellules primaires [70]. Notre laboratoire a confirmé ces résultats de réactivation par la 5dC, dans des PBMC déplétés en CD8<sup>+</sup> provenant de patients avirémiques traités par cART, et ce à des doses inférieures à la concentration plasmatique maximale approuvée en thérapie humaine [97]. Concernant le processus inverse, une déméthylation du LTR 5' peut être observée suite à un traitement par la 5dC dans les lignées infectées de manière latente [70] ou suite à une stimulation au LPS dans des cellules provenant de souris transgéniques [98]. Toutefois, aucune déméthylase ou processus menant à une déméthylation incluant par exemple les TET n'est rapportée à ce jour. Seul Weber *et al.* ont analysé le LTR 5' du VIH-1 afin de rechercher un état d'hydroxyméthylation mais ceci resta vain [93].

En plus de la régulation virale directe, la méthylation de l'ADN pourrait avoir un rôle interconnecté entre le statut de méthylation des gènes cellulaires et celui du VIH-1. En effet, une infection par le VIH-1 augmente le niveau de méthylation des gènes cellulaires [99]. De plus, plusieurs études montrent que l'infection par le VIH-1 influence l'activité et l'expression des DNMT [100].

De nombreuses zones d'ombres restent à élucider concernant les mécanismes impliqués dans l'établissement et le maintien de la méthylation du LTR 5' du VIH. La compréhension de ceux-ci est cruciale afin d'avoir une vue complète sur le contrôle épigénétique du virus latent.

## En conclusion

La latence virale du VIH-1 est mise en évidence cliniquement par la persistance d'une charge virale résiduelle observée chez les patients traités, charge virale persistante causée majoritairement par la réactivation des réservoirs cellulaires. La latence peut être sous deux formes mais la contribution de la latence pré-intégrationnelle à la persistance virale reste minoritaire. Au contraire, la latence post-intégrationnelle contribue à l'échappement des réservoirs cellulaires du VIH-1 au système immunitaire et, par conséquent, à la pathogenèse du VIH-1. Bien que la latence virale puisse être maintenue par des mécanismes

agissant au niveau post-transcriptionnel, l'inhibition de la transcription du VIH-1 est critique pour l'établissement et le maintien de la latence post-intégrationnelle. Cette inhibition est régie par un phénomène multifactoriel dont chaque élément peut être théoriquement modulé pharmacologiquement (*figure 3*). Ces dernières années ont donc vu apparaître le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques intégrant le concept de réservoirs cellulaires et leur mécanismes moléculaires associés à cet état latent. Outre une compréhension fondamentale de ces mécanismes, la mise en évidence de nouveaux mécanismes conduit à la détermination de nouvelles cibles pour l'élaboration de futures stratégies thérapeutiques dans la lutte contre le VIH.

**Remerciements.** Notre travail est supporté par l'ANRS (France Recherche Nord & Sud Sida-HIV Hépatites), le Fond belge de recherche scientifique (FRS-FNRS), la Fondation Roi Baudouin, le programme « H2020 MSC-RISE European grant » (EU4HIVCURE consortium).

**Liens d'intérêts :** Sophie Bouchat est financée par l'ULB. Carine Van Lint est directeur de recherches du FRS-FNRS.

## Références

1. Van Lint C, Bouchat S, Marcello A. HIV-1 transcription and latency : an update. *Retrovirology* 2013 ; 10 : 67.
2. Chavez L, Calvanese V, Verdin E. HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells. *PLoS pathogens* 2015 ; 11 : e1004955.
3. Dar RD, Shaffer SM, Singh A, Razoooky BS, Simpson ML, Raj A, *et al.* Transcriptional Bursting Explains the Noise-Versus-Mean Relationship in mRNA and Protein Levels. *PLoS one* 2016 ; 11 : e0158298.
4. Barton K, Hiener B, Winkelmann A, Rasmussen TA, Shao W, Byth K, *et al.* Broad activation of latent HIV-1 in vivo. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 12731.
5. Swiggard WJ, Baytop C, Yu JJ, Dai J, Li C, Schretzenmair R, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 can establish latent infection in resting CD4<sup>+</sup> T cells in the absence of activating stimuli. *J virol* 2005 ; 79 : 14179-88.
6. Baldauf HM, Pan X, Erikson E, Schmidt S, Daddacha W, Burggraf M, *et al.* SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4<sup>(+)</sup> T cells. *Nat Med* 2012 ; 18 : 1682-7.
7. Descours B, Cribier A, Chable-Bessia C, Ayinde D, Rice G, Crow Y, *et al.* SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4<sup>+</sup> T-cells. *Retrovirology* 2012 ; 9 : 87.
8. Pan X, Baldauf HM, Keppler OT, Fackler OT. Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Cell research* 2013 ; 23 : 876-85.
9. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringgaard M, Chable-Bessia C, Segal E, *et al.* SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 2011 ; 474 : 654-7.
10. Cameron PU, Saleh S, Sallmann G, Solomon A, Wightman F, Evans VA, *et al.* Establishment of HIV-1 latency in resting CD4<sup>+</sup> T cells depends on chemokine-induced changes in the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 ; 107 : 16934-9.

11. Ho YC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DI, *et al.* Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell* 2013 ; 155 : 540-51.
12. Baxter AE, O'Doherty U, Kaufmann DE. Beyond the replication-competent HIV reservoir : transcription and translation-competent reservoirs. *Retrovirology* 2018 ; 15 : 18.
13. Whitney JB, Hill AL, Sanisetty S, Penaloza-MacMaster P, Liu J, Shetty M, *et al.* Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature* 2014 ; 512 : 74-7.
14. Boritz EA, Darko S, Swaszek L, Wolf G, Wells D, Wu X, *et al.* Multiple Origins of Virus Persistence during Natural Control of HIV Infection. *Cell* 2016 ; 166 : 1004-15.
15. Wagner TA, McLaughlin S, Garg K, Cheung CY, Larsen BB, Styrchak S, *et al.* HIV latency. Proliferation of cells with HIV integrated into cancer genes contributes to persistent infection. *Science* 2014 ; 345 : 570-3.
16. Maldarelli F, Wu X, Su L, Simonetti FR, Shao W, Hill S, *et al.* HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* 2014 ; 345 : 179-83.
17. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, *et al.* HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 2009 ; 15 : 893-900.
18. Goila-Gaur R, Strebel K. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* 2008 ; 5 : 51.
19. Yu N, Wang M. Anticancer drug discovery targeting DNA hypermethylation. *Curr Med Chem* 2008 ; 15 : 1350-75.
20. Suspene R, Meyerhans A. Quantification of unintegrated HIV-1 DNA at the single cell level in vivo. *PLoS one* 2012 ; 7 : e36246.
21. Thierry S, Munir S, Thierry E, Subra F, Leh H, Zamborlini A, *et al.* Integrase inhibitor reversal dynamics indicate unintegrated HIV-1 dna initiate de novo integration. *Retrovirology* 2015 ; 12 : 24.
22. Kelly J, Beddall MH, Yu D, Iyer SR, Marsh JW, Wu Y. Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA. *Virology* 2008 ; 372 : 300-12.
23. Sloan RD, Wainberg MA. The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology* 2011 ; 8 : 52.
24. Sarracino A, Marcello A. The Relevance of Post-Transcriptional Mechanisms in HIV Latency Reversal. *Curr Pharm Des* 2017 ; 23 : 4103-11.
25. Bouchat S, Van Driessche B, Van Lint C. "Transcription (Initiation, Regulation and Elongation)". In : Hope T, Richman D, Stevenson M (eds). *Encyclopedia of AIDS*. New York : Springer ; 2014.
26. Conaway JW, Shilatifard A, Dvir A, Conaway RC. Control of elongation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 2000 ; 25 : 375-80.
27. Sobhian B, Laguette N, Yatim A, Nakamura M, Levy Y, Kiernan R, *et al.* HIV-1 Tat assembles a multifunctional transcription elongation complex and stably associates with the 7SK snRNP. *Mol Cell* 2010 ; 38 : 439-51.
28. He N, Chan CK, Sobhian B, Chou S, Xue Y, Liu M, *et al.* Human Polymerase-Associated Factor complex (PAF<sub>c</sub>) connects the Super Elongation Complex (SEC) to RNA polymerase II on chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 ; 108 : E636-45.
29. Ne E, Palstra RJ, Mahmoudi T. Transcription: Insights From the HIV-1 Promoter. *Int Rev Cell Mol Biol* 2018 ; 335 : 191-243.
30. Brady J, Kashanchi F. Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology* 2005 ; 2 : 69.
31. Das AT, Harwig A, Berkhout B. The HIV-1 Tat protein has a versatile role in activating viral transcription. *J virol* 2011 ; 85 : 9506-16.
32. van der Velden GJ, Vink MA, Berkhout B, Das AT. Tat has a dual role in simian immunodeficiency virus transcription. *J Gen Virol* 2012 ; 93 : 2279-89.
33. van Opijnen T, Boerlijst MC, Berkhout B. Effects of random mutations in the human immunodeficiency virus type 1 transcriptional promoter on viral fitness in different host cell environments. *J virol* 2006 ; 80 : 6678-85.
34. Yang X, Chen Y, Gabuzda D. ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF-kappaB. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 27981-8.
35. Chaudhary P, Khan SZ, Rawat P, Augustine T, Raynes DA, Guerriero V, *et al.* HSP70 binding protein 1 (HspBP1) suppresses HIV-1 replication by inhibiting NF-kappaB mediated activation of viral gene expression. *Nucleic acids res* 2016 ; 44 : 1613-29.
36. van der Sluis RM, Derking R, Breidel S, Speijer D, Berkhout B, Jennings RE. Interplay between viral Tat protein and c-Jun transcription factor in controlling LTR promoter activity in different human immunodeficiency virus type I subtypes. *J Gen Virol* 2014 ; 95 : 968-79.
37. Li J, Chen C, Ma X, Geng G, Liu B, Zhang Y, *et al.* Long noncoding RNA NRON contributes to HIV-1 latency by specifically inducing tat protein degradation. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 11730.
38. Cismasiu VB, Paskaleva E, Suman Daya S, Canki M, Duus K, Avram D. BCL11B is a general transcriptional repressor of the HIV-1 long terminal repeat in T lymphocytes through recruitment of the NuRD complex. *Virology* 2008 ; 380 : 173-81.
39. Rohr O, Lecestre D, Chasserot-Golaz S, Marban C, Avram D, Aunis D, *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* 2003 ; 77 : 5415-27.
40. Le Douce V, Forouzanfar F, Eilebrecht S, Van Driessche B, Ait-Ammar A, Verdikt R, *et al.* HIC1 controls cellular- and HIV-1-gene transcription via interactions with CTIP2 and HMGA1. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 34920.
41. Huang H, Santoso N, Power D, Simpson S, Dieringer M, Miao H, *et al.* FACT Proteins, SUPT16H and SSRP1, Are Transcriptional Suppressors of HIV-1 and HTLV-1 That Facilitate Viral Latency. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 27297-310.
42. Cherrier T, Le Douce V, Eilebrecht S, Riclet R, Marban C, Dequiedt F, *et al.* CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 ; 110 : 12655-60.
43. D'Orso I, Frankel AD. HIV-1 Tat : Its Dependence on Host Factors is Crystal Clear. *Viruses* 2010 ; 2 : 2226-34.
44. Eilebrecht S, Benecke BJ, Benecke A. 7SK snRNA-mediated, gene-specific cooperativity of HMGA1 and P-TEFb. *RNA Biol* 2011 ; 8 : 1084-93.
45. Eilebrecht S, Le Douce V, Riclet R, Targat B, Hallay H, Van Driessche B, *et al.* HMGA1 recruits CTIP2-repressed P-TEFb to the HIV-1 and cellular target promoters. *Nucleic acids res* 2014 ; 42 : 4962-71.
46. Reeves R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 2001 ; 277 : 63-81.
47. Henderson A, Bunce M, Siddon N, Reeves R, Tremethick DJ. High-mobility-group protein I can modulate binding of transcription factors to the U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 proviral promoter. *J virol* 2000 ; 74 : 10523-34.
48. Eilebrecht S, Wilhelm E, Benecke BJ, Bell B, Benecke AG. HMGA1 directly interacts with TAR to modulate basal and Tat-dependent HIV transcription. *RNA Biol* 2013 ; 10 : 436-44.
49. McNamara RP, Reeder JE, McMillan EA, Bacon CW, McCann JL, D'Orso I. KAP1 Recruitment of the 7SK snRNP Complex to Promoters Enables Transcription Elongation by RNA Polymerase II. *Mol Cell* 2016 ; 61 : 39-53.
50. Bruce JW, Reddington R, Mathieu E, Bracken M, Young JA, Ahlquist P. ZASC1 stimulates HIV-1 transcription elongation by recruiting P-TEFb and TAT to the LTR promoter. *PLoS pathogens* 2013 ; 9 : e1003712.

51. Mbyone U, Karn J. The Molecular Basis for Human Immunodeficiency Virus Latency. *Ann Rev Virol* 2017 ; 4 : 261-85.
52. Besnard E, Hakre S, Kampmann M, Lim HW, Hosmane NN, Martin A, *et al.* The mTOR Complex Controls HIV Latency. *Cell Host Microbe* 2016 ; 20 : 785-97.
53. De Crignis E, Mahmoudi T. The Multifaceted Contributions of Chromatin to HIV-1 Integration, Transcription, and Latency. *Int Rev Cell Mol Biol* 2017 ; 328 : 197-252.
54. Han Y, Lassen K, Monie D, Sedaghat AR, Shimoji S, Liu X, *et al.* Resting CD4<sup>+</sup> T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *J virol* 2004 ; 78 : 6122-33.
55. Grandgenett DP. Symmetrical recognition of cellular DNA target sequences during retroviral integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; 102 : 5903-4.
56. Cohn LB, Silva IT, Oliveira TY, Rosales RA, Parrish EH, Learn GH, *et al.* HIV-1 integration landscape during latent and active infection. *Cell* 2015 29 ; 160 : 420-32.
57. Sunshine S, Kirchner R, Amr SS, Mansur L, Shakhbatyan R, Kim M, *et al.* HIV Integration Site Analysis of Cellular Models of HIV Latency with a Probe-Enriched Next-Generation Sequencing Assay. *J virol* 2016 ; 90 : 4511-9.
58. Gerard A, Segeral E, Naughtin M, Abdouni A, Charmeteau B, Cheynier R, *et al.* The integrase cofactor LEDGF/p75 associates with Iws1 and Spt6 for postintegration silencing of HIV-1 gene expression in latently infected cells. *Cell host & microbe* 2015 ; 17 : 107-17.
59. Perkins KJ, Lusic M, Mitar I, Giacca M, Proudfoot NJ. Transcription-dependent gene looping of the HIV-1 provirus is dictated by recognition of pre-mRNA processing signals. *Mol Cell* 2008 ; 29 : 56-68.
60. Lusic M, Siliciano RF. Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nature reviews Microbiology* 2017 ; 15 : 69-82.
61. Verdin E, Paras Jr P, Van Lint C. Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *Embo J* 1993 ; 12 : 3249-59.
62. Van Lint C, Emiliani S, Ott M, Verdin E. Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *Embo J* 1996 Mar 1 ; 15(5) : 1112-20.
63. Verdin E. DNase I-hypersensitive sites are associated with both long terminal repeats and with the intragenic enhancer of integrated human immunodeficiency virus type 1. *J virol* 1991 ; 65(12) : 6790-9.
64. Van Lint C, Quivy V, Demonte D, Chariot A, Vanhulle C, de Walque S, *et al.* Molecular mechanisms involved in HIV-1 transcriptional latency and reactivation: implications for the development of therapeutic strategies. *Bull Mem Acad R Med Belg* 2004 ; 159 : 176-89.
65. Rafati H, Parra M, Hakre S, Moshkin Y, Verdin E, Mahmoudi T. Repressive LTR nucleosome positioning by the BAF complex is required for HIV latency. *PLoS Biol* 2011 ; 9 : e1001206.
66. Stoszko M, De Crignis E, Rokx C, Khalid MM, Lungu C, Palstra RJ, *et al.* Small Molecule Inhibitors of BAF ; A Promising Family of Compounds in HIV-1 Latency Reversal. *EBio Medicine* 2016 ; 3 : 108-21.
67. Easley R, Carpio L, Dannenberg L, Choi S, Alani D, Van Duyne R, *et al.* Transcription through the HIV-1 nucleosomes : effects of the PBAF complex in Tat activated transcription. *Virology* 2010 ; 405 : 322-33.
68. Vanti M, Gallastegui E, Respaldiza I, Rodriguez-Gil A, Gomez-Herreros F, Jimeno-Gonzalez S, *et al.* Yeast genetic analysis reveals the involvement of chromatin reassembly factors in repressing HIV-1 basal transcription. *PLoS genetics* 2009 ; 5 : e1000339.
69. Gallastegui E, Millan-Zambrano G, Terme JM, Chavez S, Jordan A. Chromatin reassembly factors are involved in transcriptional interference promoting HIV latency. *J virol* 2011 ; 85 : 3187-202.
70. Kauder SE, Bosque A, Lindqvist A, Planelles V, Verdin E. Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS pathogens* 2009 ; 5 : e1000495.
71. Mahmoudi T. The BAF complex and HIV latency. *Transcription* 2012 ; 3 : 171-6.
72. Marban C. CTIP2, un répresseur de la transcription des gènes du HIV-1 dans les cellules microgliales. Stasgourg : Université Louis Pasteur de Strasbourg I ; 2005.
73. Lusic M, Marcello A, Cereseto A, Giacca M. Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *Embo J* 2003 ; 22 : 6550-61.
74. Romani B, Kamali Jamil R, Hamidi-Fard M, Rahimi P, Momen SB, Aghasadeghi MR, *et al.* HIV-1 Vpr reactivates latent HIV-1 provirus by inducing depletion of class I HDACs on chromatin. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 31924.
75. Colin L, Van Lint C. Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies. *Retrovirology* 2009 ; 6 : 111.
76. du Chene I, Basyuk E, Lin YL, Triboulet R, Knezevich A, Chable-Bessia C, *et al.* Suv39H1 and HP1gamma are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing and post-integration latency. *Embo J* 2007 ; 26 : 424-35.
77. Imai K, Togami H, Okamoto T. Involvement of histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 16538-45.
78. Marban C, Suzanne S, Dequiedt F, de Walque S, Redel L, Van Lint C, *et al.* Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *Embo J* 2007 ; 26 : 412-23.
79. Sakane N, Kwon HS, Pagans S, Kaehlcke K, Mizusawa Y, Kamada M, *et al.* Activation of HIV transcription by the viral Tat protein requires a demethylation step mediated by lysine-specific demethylase 1 (LSD1/KDM1). *PLoS pathogens* 2011 ; 7 : e1002184.
80. Le Douce V, Colin L, Redel L, Cherrier T, Herbein G, Aunis D, *et al.* LSD1 cooperates with CTIP2 to promote HIV-1 transcriptional silencing. *Nucleic acids research* 2012 ; 40 : 1904-15.
81. Desplats P, Dumaop W, Smith D, Adame A, Everall I, Letendre S, *et al.* Molecular and pathologic insights from latent HIV-1 infection in the human brain. *Neurology* 2013 ; 80 : 1415-23.
82. Narasipura SD, Kim S, Al-Harathi L. Epigenetic regulation of HIV-1 latency in astrocytes. *J virol* 2014 ; 88 : 3031-8.
83. Ding D, Qu X, Li L, Zhou X, Liu S, Lin S, *et al.* Involvement of histone methyltransferase GLP in HIV-1 latency through catalysis of H3K9 dimethylation. *Virology* 2013 ; 440 : 182-9.
84. Friedman J, Cho WK, Chu CK, Keedy KS, Archin NM, Margolis DM, *et al.* Epigenetic silencing of HIV-1 by the histone H3 lysine 27 methyltransferase enhancer of Zeste 2. *J virol* 2011 ; 85 : 9078-89.
85. Matsuda Y, Kobayashi-Ishihara M, Fujikawa D, Ishida T, Watanabe T, Yamagishi M. Epigenetic heterogeneity in HIV-1 latency establishment. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 7701.
86. Zhang HS, Du GY, Liu Y, Zhang ZG, Zhou Z, Li H, *et al.* UTX-1 regulates Tat-induced HIV-1 transactivation via changing the methylated status of histone H3. *Int J Biochem Cell Biol* 2016 ; 80 : 51-6.
87. Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen JV, Cloos PA, Rappsilber J, *et al.* TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* 2011 ; 473 : 343-8.
88. Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 2010 ; 463 : 1042-7.
89. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell* 2011 ; 146 : 866-72.

90. Blazkova J, Trejbalova K, Gondois-Rey F, Halfon P, Philibert P, Guiguen A, *et al.* CpG methylation controls reactivation of HIV from latency. *PLoS pathogens* 2009 ; 5 : e1000554.
91. Blazkova J, Murray D, Justement JS, Funk EK, Nelson AK, Moir S, *et al.* Paucity of HIV DNA methylation in latently infected, resting CD4<sup>+</sup> T cells from infected individuals receiving antiretroviral therapy. *J virol* 2012 ; 86 : 5390-2.
92. Palacios JA, Perez-Pinar T, Toro C, Sanz-Minguela B, Moreno V, Valencia E, *et al.* Long-term nonprogressor and elite controller patients who control viremia have a higher percentage of methylation in their HIV-1 proviral promoters than aviremic patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J virol* 2012 ; 86 : 13081-4.
93. Weber S, Weiser B, Kemal KS, Burger H, Ramirez CM, Korn K, *et al.* Epigenetic analysis of HIV-1 proviral genomes from infected individuals : predominance of unmethylated CpG's. *Virology* 2014 ; 449 : 181-9.
94. Trejbalova K, Kovarova D, Blazkova J, Machala L, Jilich D, Weber J, *et al.* Development of 5' LTR DNA methylation of latent HIV-1 provirus in cell line models and in long-term-infected individuals. *Clin Epigenetics* 2016 ; 8 : 19.
95. Dev RR, Ganji R, Singh SP, Mahalingam S, Banerjee S, Khosla S. Cytosine methylation by DNMT2 facilitates stability and survival of HIV-1 RNA in the host cell during infection. *Biochem J* 20176 ; 474 : 2009-26.
96. Bednarik DP, Cook JA, Pitha PM. Inactivation of the HIV LTR by DNA CpG methylation : evidence for a role in latency. *EMBO J* 1990 ; 9 : 1157-64.
97. Bouchat S, Delacourt N, Kula A, Darcis G, Van Driessche B, Corazza F, *et al.* Sequential treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and deacetylase inhibitors reactivates HIV-1. *EMBO Mol Med* 2015 ; 8 : 117-38.
98. Tanaka J, Ishida T, Choi BI, Yasuda J, Watanabe T, Iwakura Y. Latent HIV-1 reactivation in transgenic mice requires cell cycle -dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR. *Aids* 2003 ; 17 : 167-75.
99. Maricato JT, Furtado MN, Takenaka MC, Nunes ER, Fincatti P, Meliso FM, *et al.* Epigenetic modulations in activated cells early after HIV-1 infection and their possible functional consequences. *PLoS one* 2015 ; 10 : e0119234.
100. Boehm D, Ott M. Host Methyltransferases and Demethylases: Potential New Epigenetic Targets for HIV Cure Strategies and Beyond. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2017 ; 33 : S8-22.