

Bloquer la transcription du VIH pour verrouiller le virus

Blocking HIV transcription to lockdown the virus

Morgane Da Rocha¹

Mikaël Poirier¹

Branden Bonham^{1,2}

Brendan Bell^{1,3}

¹ Département de microbiologie et d'infectiologie, Faculté de médecine et sciences de la santé,

Université de Sherbrooke et Centre de recherche du CHUS, Sherbrooke, QC, Canada

² Département de biologie, Université Bishop's, Sherbrooke, QC, Canada

³ Département de microbiologie et d'infectiologie, Faculté de médecine et sciences de la santé, PRAC - 3201, rue Jean-Mignault, Sherbrooke (Québec) J1E 4K8, Canada

Article accepté le 24 février 2022

Résumé. La latence du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est actuellement un obstacle majeur à l'éradication des cellules infectées. En effet, en état de latence, le VIH se réplique peu et produit une faible quantité de protéines virales ; il est donc hors d'atteinte des traitements antirétroviraux ciblant les enzymes essentielles du cycle viral et invisible pour le système immunitaire qui ne peut détecter les protéines virales à la surface des cellules infectées. De plus, la latence étant un état réversible maintenu principalement par la pression exercée par les traitements antirétroviraux sur le virus qui peut se réactiver lorsque ces traitements sont interrompus. En conséquence, les personnes infectées par le VIH sont contraintes de prendre les traitements antirétroviraux à vie. Pour ces raisons, des molécules actuellement à l'étude ciblent la latence, notamment à l'aide d'une stratégie dite de blocage et verrouillage (*block and lock*) qui aspire à maintenir le VIH dans un état de latence profonde. Le développement de telles molécules requiert une connaissance approfondie des mécanismes régissant la transcription des gènes du VIH. Dans cette revue, nous décrivons les mécanismes permettant la transcription des gènes viraux ainsi que les molécules associées à la stratégie de blocage et verrouillage.

Mots-clés : VIH, latence, transcription, bloquer et verrouiller

Abstract. Latency of the human immunodeficiency virus (HIV) is currently a major obstacle for the eradication of infected cells. During latency, HIV displays little or no replication and produces negligible quantities of protein. Latent HIV is unaffected by current anti-retroviral drugs and makes it invisible to the host immune system. Latency is enforced by the pressure of antiretroviral treatment, but reactivation occurs upon treatment interruption. Therefore, HIV infected patients must take antiretroviral drugs for life. The development of new molecules to achieve a cure or remission for HIV must target latent HIV, with a growing focus on the "block and lock" strategy which seeks to impose a permanent state of deep latency on HIV. The development of novel molecules to achieve this requires a detailed knowledge of the mechanisms of HIV transcription. Here, we will review the mechanisms controlling HIV transcription and the potential block and lock molecules currently under study.

Key words: HIV, latency, transcription, block and lock

Introduction

Le développement des traitements antirétroviraux de haute activité au milieu des années 1990 a permis de contrôler la pandémie engendrée par le virus de l'immunodéficience

humaine (VIH) puisqu'ils ont permis de réduire la mortalité, la morbidité ainsi que la transmission du virus [1]. Cependant, ces molécules ne permettent pas d'éradiquer le virus des cellules infectées, mais seulement de contenir le VIH à l'intérieur de celles-ci et de restreindre sa réplication car le VIH est capable d'entrer dans un état de latence rapidement après avoir infecté la cellule [2, 3].

La latence virale est un état dans lequel les gènes du virus sont exprimés de manière résiduelle, car la transcription

Correspondance : B. Bell
<Brendan.Bell@USherbrooke.ca>

est réduite [4]. En conséquence, la production de protéines virales et de virions est restreinte. Dans cet état, le virus est protégé à la fois des traitements antirétroviraux et du système immunitaire, puisque les cellules infectées par un virus latent ne seront pas reconnues ou éliminées par l'organisme. Cela permet au virus de s'établir à long terme chez son hôte, par la création d'un réservoir de cellules infectées hébergeant un virus latent qui peut se réactiver si la pression exercée par les traitements antirétroviraux sur le virus est interrompue [5].

Les réservoirs latents existent sous forme cellulaire et anatomique. Les réservoirs cellulaires sont composés de différentes populations de cellules infectées par un virus latent. Parmi ces populations, les cellules T centrales mémoires et transitionnelles mémoires représentent le réservoir principal du VIH [6]. D'autres populations de lymphocytes T participent également au réservoir viral, et celles-ci sont décrites en détail dans ce numéro [7]. Ces réservoirs persistent chez les patients sous traitements antirétroviraux du fait de la survie et la prolifération homéostatique de ces populations cellulaires [6].

Certaines études suggèrent que les monocytes et macrophages pourraient aussi faire partie du réservoir viral, cependant leur implication n'a pas été démontrée *in vivo* de manière convaincante. En effet, si certaines études ont détecté de l'ADN viral dans les monocytes de patients sous traitements antirétroviraux présentant une charge virale indétectable [8, 9], les résultats obtenus par les différentes équipes de recherche sont variables. De la même façon, on retrouve de l'ADN viral intégré au génome de différents macrophages tissulaires tels que les macrophages intestinaux, duodénaux, urétraux, ou la microglie [10]. Ces résultats suggèrent qu'il existe un réservoir macrophagique, mais sa taille ainsi que les populations de macrophages impliquées ne sont pas clairement définies.

Les réservoirs anatomiques sont des compartiments dans lesquels le virus est à l'abri du système immunitaire et où la pénétration des molécules antirétrovirales est sous-optimale, ce qui permet au virus de se répliquer. Ces compartiments sont dits sanctuaires et il s'agit du système nerveux central [11] ou des nœuds lymphatiques [12]. Certains tissus sont en effet naturellement immunotolérants. Les cellules présentes dans ces sites anatomiques peuvent, entre autres, exprimer des molécules immunosuppressives qui vont induire la tolérance des cellules effectrices du système immunitaire, ce qui protège les cellules infectées de leur action. Ces sites sont dits immunologiquement privilégiés, parmi ceux-ci on trouve par exemple le tissu testiculaire [13]. Ces réservoirs peuvent également être isolés de la circulation sanguine, empêchant la distribution des molécules antirétrovirales à une concentration

optimale pour contrôler le virus. Par exemple, le système nerveux central est séparé du système sanguin par la barrière hémato-encéphalique, une barrière cerveau-sang qui limite le transport de certaines molécules antirétrovirales jusqu'aux cellules infectées [11, 14].

Puisque les traitements antirétroviraux n'ont pas les effets escomptés sur le réservoir viral, qu'il soit cellulaire ou anatomique, de nouvelles stratégies sont à l'étude afin de lutter contre le VIH. La possibilité d'éliminer le réservoir latent a tout d'abord été envisagée, notamment au travers de la stratégie dite de réactivation et élimination ou « *shock and kill* ».

Le principe de la stratégie « réactiver pour tuer » est d'induire la réactivation du virus latent en traitant les cellules infectées avec des agents d'inversion de latence virale (ou *Latency Reversing Agents*, LRA). Le virus réactivé va produire des protéines virales qui seront exprimées à la surface de la cellule infectée, ce qui permettra sa reconnaissance et son élimination par le système immunitaire. Le but de cette méthode est donc de provoquer la mort des cellules réservoirs, et de ce fait mener à l'éradication du virus chez les personnes infectées [15]. De nombreuses molécules ont été testées pour leur potentiel de réactivation de la latence virale, telles que le vorinostat, un inhibiteur des désacétylases d'histones (HDAC) qui *in vitro* provoque la réactivation du provirus latent dans des lignées cellulaires ainsi que dans des cellules primaires [16, 17]. Ces résultats prometteurs ont mené à des essais cliniques. Dans ces études, le vorinostat entraînait une augmentation de l'expression des gènes viraux chez les patients infectés, cependant cette augmentation n'était pas associée à une diminution du réservoir viral ni à une activation des cellules du système immunitaire [18].

À ce jour, aucun LRA n'a prouvé son efficacité en essai clinique [19]. La cause principale de cet échec est l'hétérogénéité du réservoir viral. En effet, les différentes populations de cellules réservoirs ne sont pas activées de la même façon selon le LRA utilisé [20], et cette activation varie également entre les tissus analysés [21]. Ces problèmes sont actuellement étudiés afin de proposer des améliorations, telles que la combinaison de plusieurs LRA ou le moment de la prise du traitement [22]. Cependant, ces résultats décevants ont permis de remettre l'accent sur l'étude d'une approche alternative appelée bloquer et verrouiller ou « *block and lock* ». Cette stratégie de blocage a pour but de maintenir le virus dans un état de latence profonde, même en absence de traitement antirétroviral. Cet état serait atteint par traitement des cellules infectées avec des molécules qui vont perturber les mécanismes de transcription du virus. Donc, pour développer cette stratégie, une connaissance approfondie des mécanismes régulant la transcription des gènes viraux est requise.

La transcription des gènes du VIH

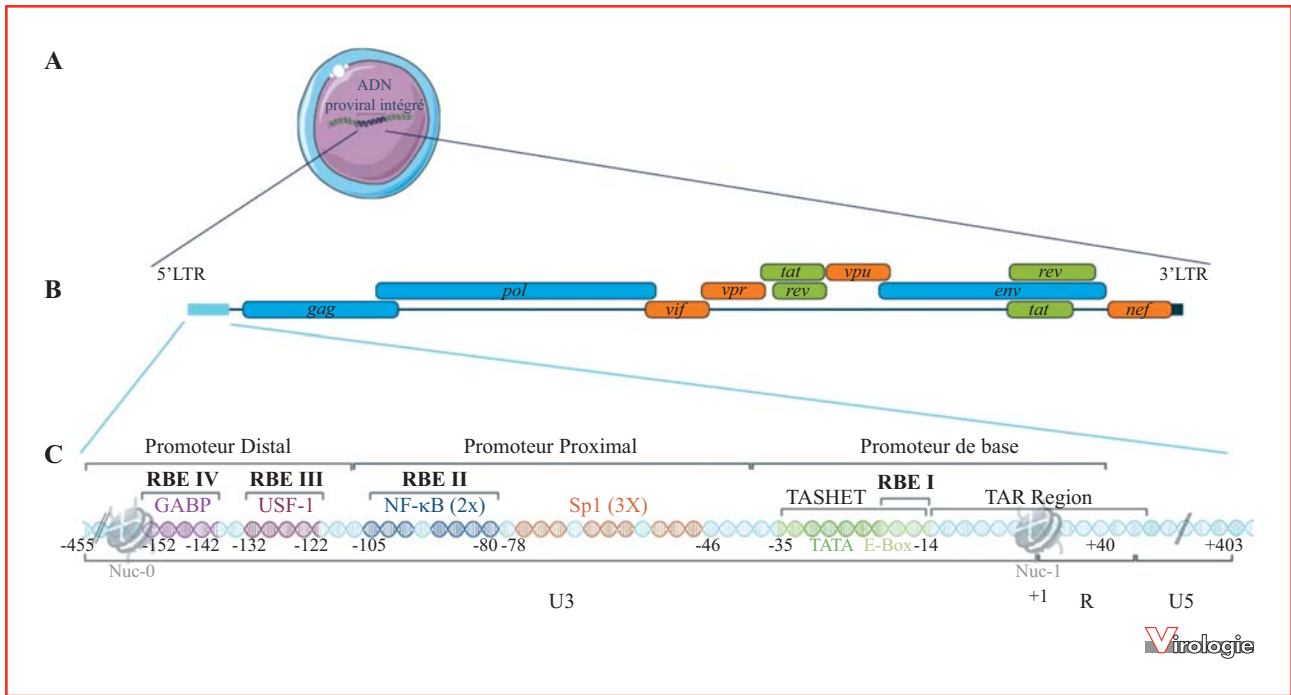
Le promoteur viral

La transcription des gènes du VIH ainsi que le développement de stratégies de blocage et verrouillage reposent notamment sur l'étude des facteurs de transcription ciblant le promoteur viral. En effet, ils représentent des cibles thérapeutiques prometteuses, car ils pourraient influencer la capacité du virus à créer des réservoirs et à se cacher du système immunitaire. L'étude de ces facteurs de transcription est accompagnée de l'étude du génome viral, dont l'organisation est décrite ci-dessous.

Le génome du VIH qui est intégré dans l'ADN de la cellule hôte (*figure 1A*) est composé de neuf gènes, parmi ces gènes, trois sont considérés majeurs et permettent la construction de nouveaux virions, il s'agit de *gag*, *pol* et *env* qui sont représentés en bleu sur la *figure 1B* [23,24]. Les deux gènes impliqués dans la production des protéines régulatrices essentielles *Tat* et *Rev* sont représentés en vert sur la *figure 1B* [25-27]. Et finalement, les quatre gènes qui codent les protéines accessoires *Vif*, *Vpr*, *Vpu/Vpx* et *Nef* sont représentés en orange sur la *figure 1B* [28]. L'ensemble des protéines virales permet au virus de se répliquer et de contrôler plusieurs voies de signalisation cellulaire, menant à son échappement de la vigilance du système immunitaire [29-34]. L'une des particularités du génome viral est que l'entièreté de ses gènes est contrôlée par un unique promoteur d'environ 634 paires de bases (pb). Ce promoteur, qui va déterminer si le virus intégré va produire de nouveaux virions ou être en latence transcriptionnelle, est influencé par plusieurs facteurs de transcription cellulaires et par la protéine virale *Tat* [26, 35-37]. Ce pilier de l'activité virale va permettre une production active pour une prolifération menant à l'infection d'autres cellules ou d'autres organismes, ou bien à installer une latence transcriptionnelle, et par la même occasion, établir des réservoirs de latence où le virus va se cacher du système immunitaire et perdurer malgré un traitement antirétroviral [38-40].

Le promoteur viral du VIH, qui se situe dans le 5'-LTR (*Long Terminal Repeat*), est constitué de plusieurs régions d'importance (*figure 1C*) [41]. On peut distinguer deux découpages différents du promoteur viral. Le premier découpage du promoteur le divise en trois segments : la région U3 (unique 3) en position -455 à -1 pb sur le génome du virus, ensuite la région R (répétée) en position +1 à +98 et la région U5 (unique 5) en position +99 à +178 pb sur le promoteur. La région U3 contient les sites pour les liaisons avec les facteurs positifs ou négatifs de la transcription. La région R contient le site où la polymérase à ARN de type II (Pol II) va commencer la transcription et se mettre en pause lorsque les éléments requis pour une transcription productive ne sont pas présents [42]. Ces éléments, ainsi que leur

implication dans l'initiation de la transcription des gènes du VIH, seront explorés plus en détail dans la partie « Initiation de la transcription » de cet article. Le deuxième découpage du promoteur détermine sa composition en trois segments : une région U3, avec la région promotrice proximale (-105 à -40 pb), qui contient les principales régions régulatrices positives de la transcription avec les sites de liaison aux facteurs Sp1 (*Specificity protein 1*) et NF- κ B (*nuclear factor kappa-B*) ; la région promotrice distale (-455 à -105 pb) qui contient des éléments de régulation négative et quelques éléments positifs de la transcription ; puis la région du promoteur de base (*core promoter*) qui contient la région TASHET (*TATA box and adjacent sequence of HIV essential for Tat trans-activation*) (-14 à -38 pb) permettant la liaison avec les différents facteurs positifs de la transcription tels que USF (*upstream stimulatory factor*)-1, USF-2 et TF (*transcription factor*)II-I [43], ainsi que les facteurs du complexe de pré-initiation de la transcription (PIC), composé de TBP (*TATAA binding protein*), TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH, permettant de recruter la Pol II [41, 44]. En amont de TASHET (-46 à -78 pb ; figures 1C), se trouvent trois sites Sp1 permettant la liaison avec des protéines du même nom. La protéine Sp1 est reconnue pour être un facteur positif de la transcription ubiquitaire dans plusieurs promoteurs cellulaires et viraux (*figure 2A*) [45-47]. Ce facteur n'est pas obligatoire pour amorcer la transcription, car il peut être compensé par les facteurs de transcription de la voie NF- κ B [48]. Malgré cela, Sp1 est nécessaire pour un niveau de transcription optimal. De plus, la protéine virale *Tat* peut venir phosphoryler Sp1 pour accroître l'efficacité du processus de transcription [49]. Dans un contexte d'arrêt de la transcription, CTIP2 (*chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2*) peut recruter HDAC1 et HDAC2 pour inhiber cette région et ainsi maintenir une inhibition de Sp1 tout en contrôlant l'environnement chromatinien pour empêcher un environnement favorable à la transcription [50, 51]. CTIP2 peut également interagir avec la méthylase d'histone (HMT) SUV39H1, responsable de la marque épigénétique répressive de transcription H2K9me3 [50]. De plus, la protéine virale *Vpr* peut entraîner la dégradation par le protéasome de CTIP2, ce qui permet la réactivation de la transcription des gènes du VIH [52]. En amont de la région Sp1 (-80 à -105 pb ; *figure 1C*) se trouvent les deux sites de reconnaissance de la voie de régulation NF- κ B. Cette dernière est très complexe avec trois sous-voies de régulation [canonique, non-canonique et atypique indépendante de IKK (*inhibitor of NF- κ B kinase*)] composée de plusieurs sous-unités protéiques telles que : p50^{NF- κ B1}, p52^{NF- κ B2}, p65^{RelA}, RelB et c-Rel [53]. C'est l'agencement des sous-unités en homodimère ou hétérodimère qui va déterminer le devenir de la voie. Dans le cas du promoteur du VIH, NF- κ B devient un facteur de



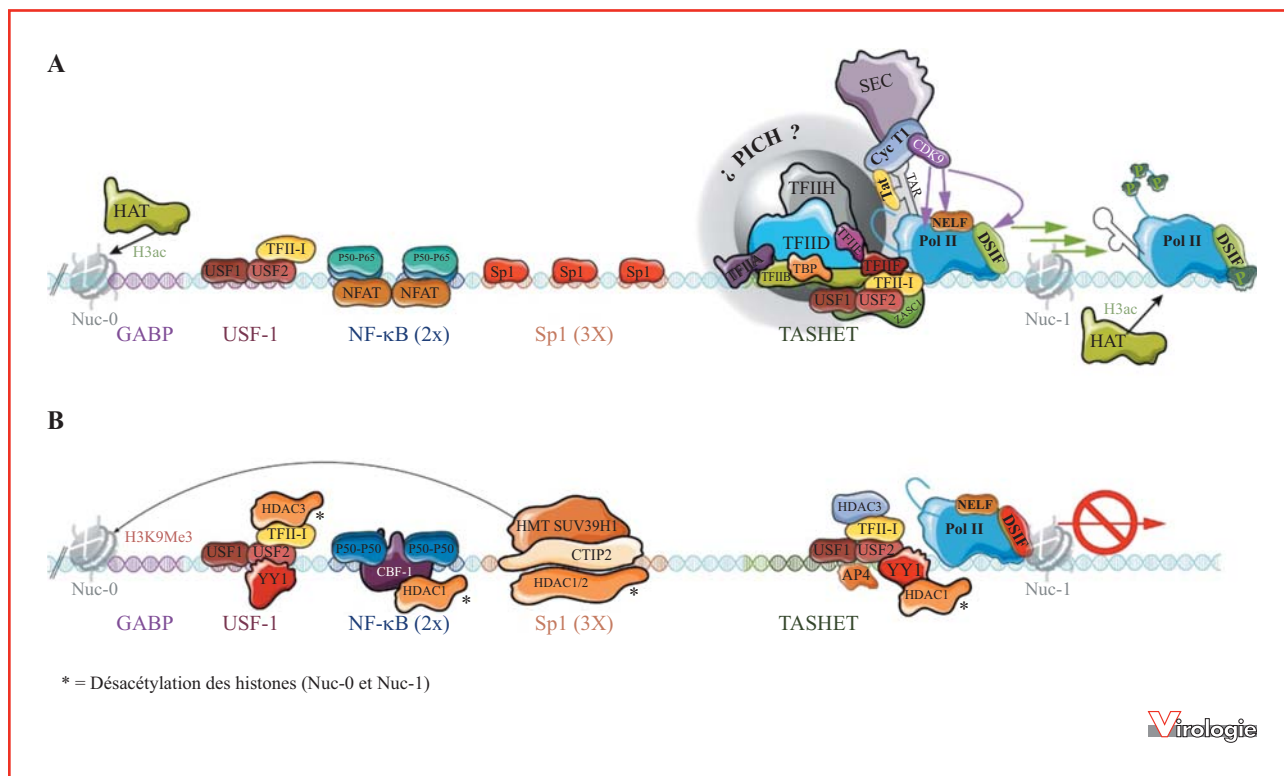
régulation positif quand deux hétérodimères $p50^{NF-\kappa B1}/p65^{RelA}$ se lient aux sites de liaison et activent la voie canonique qui va permettre le recrutement d'autres facteurs positifs tels que NFAT1 (*nuclear factor of activated T-cell 1*) et NFAT5 (*figure 2A*) [54, 55]. À l'opposé, l'agencement des sous-unités homo-dimérique $p50^{NF-\kappa B1}/p50^{NF-\kappa B1}$ va, d'une part, entrer en compétition avec les sites NF- κB pour $p50^{NF-\kappa B1}/p65^{RelA}$ et, d'autre part, favoriser le recrutement de CBF-1 (*C-promoter binding factor-1*) et avoir un impact négatif sur l'initiation de la transcription (*figure 2B*) [54, 56].

D'autres facteurs de transcription peuvent interagir avec la région promotrice et influencer l'initiation de la transcription, tels que l'acétyltransférase d'histone (HAT), USF-1, AP4 (*activating enhancer-binding protein 4*) ou ZASC1 (*zinc finger associated with squamous cell carcinoma*) (*figures 2A et B*). En plus des régions et des facteurs de transcription mentionnés ci-dessus, le VIH contient quatre régions disséminées sur le promoteur. Ces régions

sont nommées RBE pour *Ras-Responsive factor Binding Element* [57, 58].

Le premier site RBE I se trouve de la position -26 à +5 pb, alors que le site RBE II est sur la position -81 à -104 pb, tandis que le site RBE III est situé de -122 à -131 pb et que RBE IV est situé de -142 à -151 pb (*figure 1C*). Selon la protéine se liant aux RBE, ils vont permettre de favoriser ou d'inhiber l'initiation de la transcription. Par exemple, les complexes protéiques RBF, pour *Ras-responsive Binding Factor*, comportant RBF-1 (composé de GABP α (*GA-binding protein*) et GABP β 1) et RBF-2 (composé de USF-1, USF-2 et TFII-1) vont mener à l'activation (*figure 2A*). Par contre, les protéines YY1 et AP4 vont inhiber le processus d'initiation en se liant aux sites RBE I (E-box) et RBE III, respectivement (*figure 2B*) [59].

Le promoteur du VIH est la clé pour contrôler la latence du virus, mais plus encore certaines zones stratégiques telles que les régions de liaison à Sp1, NF- κB ou la région du promoteur de base avec la boîte TATA [60].



Virologie

Figure 2. Éléments activateurs et répresseurs de la transcription. Le promoteur viral contient des motifs d'ADN liant des protéines qui vont avoir un impact positif ou négatif sur l'expression des gènes viraux. (A) Les facteurs influençant la transcription de manière positive. Tel le complexe de pré-initiation canonique (PIC) de la transcription composée des différents facteurs TFII vont se lier à la boîte TATA et les séquences environnantes permettant de recruter la Pol II. Le complexe PIC est assisté par le complexe PICH (*Pre-Initiation Complex of HIV*), il reste cependant des interrogations sur la conformation prise par PICH au niveau de la région TASHET. De plus, les facteurs USF1 et USF2 vont stimuler l'initiation de la transcription avec SEC (*Super Elongation Complex*). Au niveau chromatique, les HAT (*Histone Acetyltransferase*) vont acétyler la chromatine permettant son ouverture pour permettre de libérer la voie à la transcription. D'autres protéines majeures comme Sp1 et P50-P65 de NF-κB associées à NFAT vont favoriser le début de la transcription. (B) Les facteurs influençant la transcription de manière négative. Le facteur YY1 va inhiber l'action de USF2, alors que HDAC3 va désacétyler les histones, ce qui va conduire au repliement des histones. De plus, l'action combinée des dimères P50-P50 de la voie NF-κB en association avec CBF-1 et HDAC1 (*Histone Deacetylase 1*), vont bloquer le site NF-κB. Ils vont donc entrer en compétition avec la liaison des facteurs positifs de cette région. Pour le site Sp1, les facteurs CTIP2, HDAC1, HDAC2 et HMT SUV39H1 vont se lier aux trois sites Sp1. Les HDAC1 et HDAC2 vont désacétyler les histones environnantes. D'autre part HMT SUV39H1 va tri-méthyliser les histones 3 lysine en position 9, ce qui va verrouiller la chromatine et inhiber toute activité transcriptionnelle.

De nombreux facteurs de transcription peuvent interagir avec le promoteur et influencer la transcription de manière positive ou négative sur le promoteur du VIH [61, 62]. Dans les prochaines lignes, nous explorerons les plus prometteurs comme cibles moléculaires pour la stratégie de blocage et verrouillage du VIH. On peut juger l'importance et la spécificité de cette dernière en permutant le promoteur de base du VIH avec le promoteur d'un virus de la famille des Adénovirus. On observe alors que le virus perd sa capacité à se répliquer efficacement car il n'y a plus de transactivation par Tat [63]. La TATA Box est donc essentielle à la transcription des gènes du VIH, mais une étude montre que les motifs CTGC de part et d'autre de la boîte TATA sont également impliqués dans la transcription des gènes du VIH. En

effet, une expérience de retard de mobilité sur gel a démontré que certaines protéines sont retenues par le promoteur de base du VIH, mais pas par celui de l'Adénovirus, et que cette reconnaissance est dépendante des motifs CTGC [64]. Lorsque ces motifs sont mutés, les protéines en question ne reconnaissent plus le promoteur et la transactivation du promoteur viral est diminuée. Cette région, la boîte TATA entourée de motifs CTGC, se nomme TASHET, et le complexe protéique liant cette région se nomme PICH (*pre-initiation complex of HIV*) (figures 1C et 2A) [64]. En résumé, certains éléments de la région promotrice du VIH, dont les motifs CTGC de part et d'autre du motif TATA, sont essentiels à la réplication de ce dernier et ces éléments sont exclusifs au promoteur de ce virus. L'identification de

ces protéines cellulaires liant TASHET pourrait permettre de fournir de nouvelles pistes pour des cibles thérapeutiques qui influenceront, ou contrôleront le niveau de transcription du VIH [41].

En résumé, le promoteur viral est composé de différents éléments de liaison qui vont permettre le recrutement de différents facteurs de transcription impliqués dans la modulation de l'expression des gènes du VIH. La nature de ces derniers va influencer l'expression des gènes viraux ou l'entrée en latence du VIH. Les stratégies visant à maintenir le virus en latence profonde ciblent ces protéines pour bloquer la transcription virale. De ce fait, les étapes de la transcription ainsi que les facteurs cellulaires et viraux impliqués sont actuellement à l'étude. La transcription des gènes du VIH se divise en trois étapes majeures : l'initiation, la pause de la Pol II et l'élongation de la transcription.

Initiation de la transcription

Lors de l'étape d'initiation, afin de permettre la transcription de l'ARNm viral et de produire de nouveaux virions, l'ADN viral va utiliser le matériel de réplication cellulaire, dont les protéines permettant le recrutement de Pol II au site d'initiation de la transcription à la position +1. Cette étape, nommée pré-initiation de la transcription, fait intervenir les protéines du PIC et débute par l'appariement de la protéine TBP à la région TATA dans le sillon mineur de l'ADN en position -25 à -28 pb avant le site d'initiation de la transcription (TSS, *Transcription Start Site*) [65] dans la région TASHET. De plus, les protéines Sp1 favorisent le transport de TBP au promoteur grâce à la région riche en glutamine de la protéine [66]. Une fois liée, la protéine TBP va replier l'ADN de 80°, ce qui favorise le recrutement des facteurs de transcription [65, 67]. Suite à cet événement, TFIID va être recruté et se lier à TBP, ce qui entraîne le recrutement des futurs TF [68]. Ensuite, le facteur TFIIA se lie en amont de la boîte TATA permettant une stabilisation du complexe ADN-TBP-TFIID et agissant en tant qu'inhibiteur des répresseurs de TFIIB [69, 70]. Le facteur TFIIB est ensuite recruté et se lie sur l'ADN en amont et en aval du complexe protéique [70]. Une fois stabilisé, il va permettre le recrutement de Pol II. Par la suite, TFIIF se lie au promoteur et joue un rôle stabilisant pour le complexe [71]. Suivant cela, TFIIE va se lier au promoteur favorisant le recrutement de TFIIH (*figure 2A*), ce qui va compléter le PIC qui a pour rôle d'ouvrir la double hélice de l'ADN et de créer une bulle de transcription [72-74]. Pour commencer la transcription, TFIIH va phosphoryler le domaine C-terminal (CTD) de la Pol II, ce qui l'amène à quitter le promoteur et à amorcer la transcription qui peut avorter [75]. En effet, il arrive souvent que la transcription ne soit pas immédiatement productive, car l'association rapide des facteurs négatifs de la transcription NELF

(*Negative Elongation Factor*) et DSIF (*DRB Sensitivity Inducing Factor*) à la Pol II provoque une pause de l'enzyme [76].

La pause de la Pol II

Lors de la pause, l'association rapide de NELF et DSIF à la Pol II empêche le passage à la phase d'élongation de la transcription. Sous leur forme non-phosphorylée, NELF et DSIF inhibent la progression de la polymérase sur l'ADN (*figure 2B*). DSIF s'attache à la Pol II en cinq points, soit en position 5' de l'ADN et à l'ARN naissant en formant des pinces qui empêchent la Pol II de continuer la transcription [77]. NELF s'attache à la Pol II à côté du site d'entrée de l'ADN, et, avec ses deux régions « tentacules », elle contacte DSIF pour stabiliser l'interaction DSIF-Pol II [76]. Pour que la transcription puisse continuer, NELF et DSIF ont besoin d'être phosphorylés par le complexe P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*) actif [78]. P-TEFb est composé de la Cycline T1 (CycT1), qui est sa sous-unité régulatrice, et de la kinase dépendante de la cycline 9 (CDK9, *cyclin dependent kinase 9*), sa sous-unité catalytique. Ce complexe dimérique existe sous deux formes dans la cellule, la forme active et la forme inactive. La forme inactive est associée au complexe ribonucléoprotéique 7SK snRNP. 7SK snRNP est composé de l'ARN 7SK ainsi que des protéines HEXIM1/2 (*HMBA inducible proteins 1/2*), LARP7 (*La-related protein 7*) et MePCE (*Methylphosphate capping enzyme*). P-TEFb est séquestré par le complexe 7SK snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein*) du fait de l'interaction de la CycT1 avec HEXIM1/2 (*figure 3A*) [79]. Cette interaction inhibe l'activité enzymatique de P-TEFb [79, 80]. La forme inactive de P-TEFb au sein du complexe 7SK-snRNP peut également être associée à CTIP2 et HMGA1. En effet, CTIP2 peut interagir avec HEXIM1 et inhiber l'activité kinase de CDK9 [81]. Cette régulation négative de P-TEFb par CTIP2 est importante pour le maintien du réservoir latent microglial [50].

P-TEFb peut être recruté de différentes manières au niveau du promoteur viral. Sous sa forme inactive, le complexe P-TEFb associé à 7SK-snRNP occupe le promoteur latent du VIH aux alentours du TSS [81, 82], où il pourrait être recruté par KAP1 (*KRAB-associated protein-1*) ou HMGA1 (*High Mobility Group A1*) [83, 84]. En effet, HMGA1 peut interagir avec la protéine cellulaire CTIP2 associée au complexe P-TEFb-7SK-snRNP [85]. Dans le cas de la transcription basale, le complexe P-TEFb actif est apporté au promoteur par NF- κ B, qui se lie lui-même à des séquences consensus présentes en amont des régions Sp1 [86].

Le recrutement de P-TEFb actif au niveau du promoteur viral va provoquer la phosphorylation de la Serine 2 des répétitions heptades de la queue CTD de la Pol II, une modification associée à la phase d'élongation de la

transcription [87]. CDK9 va également phosphoryler les régulateurs négatifs DSIF et NELF [88]. La phosphorylation de NELF par CDK9 cause sa dissociation de la Pol II, mais la phosphorylation de DSIF induit un changement de conformation changeant DSIF en un facteur positif de transcription (*figure 2A*) [78]. L'ensemble de ces phosphorylations par CDK9 augmente la capacité processive de la Pol II et permet la transition vers l'étape d'élongation (*figure 3B*).

Finalement, il est important de noter que si la pause de la Pol II est souvent considérée comme une étape systématique de la transcription du VIH, une étude récente suggère que cet événement survient en réalité de manière stochastique [89].

Rôle de Tat dans la transcription

P-TEFb peut également être recruté lors de la transactivation par Tat du promoteur viral, ce qui amène à un niveau de transcription plus élevé. En effet, la protéine virale Tat augmente considérablement le recrutement de la forme active de P-TEFb au niveau du promoteur du VIH (*figure 3A*). La Pol II, recrutée au niveau du promoteur du VIH, transcrit la région +1 à +59 du génome viral, correspondant à l'ARN TAR (*trans-activation response*) [90, 91]. L'ARN TAR est un ARN conservé en forme de tige possédant un renflement (+22 à +24 nucléotides (nt)) et une boucle (+29 et 33nt) [92]. La région riche en arginine de la protéine virale Tat permet son interaction avec l'ARN TAR au niveau du renflement, tandis que sa région cœur riche en lysines se lie à la protéine CycT1, elle-même liée à CDK9 et formant P-TEFb. Ces interactions amènent au recrutement de Tat et P-TEFb au niveau du promoteur viral (*figure 3A*) [93, 94]. De plus, P-TEFb va interagir avec la protéine cellulaire AFF1/4 (*AF4/FMR2 family member 1/4*), qui forme un complexe avec les protéines ELL2 (*elongation factor for RNA polymerase II 2*), ENL (*eleven nineteen leukemia*) et AF9 (*ALL1-fused gene from chromosome 9*) (*figure 3B*) [95]. Ce complexe est appelé complexe de super élongation (SEC), il permet de garder les ARNm transcrits en alignement avec le site catalytique de la Pol II, l'empêchant ainsi de reculer [96]. Cela va permettre l'élongation de la transcription des gènes viraux.

Le recrutement du complexe P-TEFb par Tat permet donc l'induction de modifications post-traductionnelles menant à la sortie de la pause de la polymérase, ainsi que le recrutement de protéines qui vont participer à l'élongation de la transcription [93, 94]. La forme active de P-TEFb est le complexe protéique seul ou associé à des facteurs de transcription tels que Brd4 (*Bromodomain-containing protein 4*) ou le SEC [97]. En présence de Tat, la protéine virale va entrer en compétition avec HEXIM1/2 pour la liaison de CycT1. L'affinité de cette dernière pour Tat étant plus forte

que pour HEXIM1/2, P-TEFb va être recruté au niveau du promoteur viral (*figure 3A*) [93, 94]. Tat peut être recruté au promoteur du VIH sans que l'ARN TAR soit transcrit, mais déplace la forme inactive du complexe 7SK snRNP lors de sa liaison avec l'ARN TAR nouvellement transcrit, favorisant la forme active de P-TEFb pour la phosphorylation la queue CTD de la Pol II [98].

Ce mécanisme de recrutement par Tat de la forme active de P-TEFb au niveau du promoteur viral peut être perturbé par des protéines cellulaires, ce qui va empêcher la transactivation du promoteur viral et favoriser la latence. Par exemple, HMGA1 peut entrer en compétition avec Tat pour la liaison de l'ARN TAR, ce qui influence négativement la transcription [99]. Dans les cellules de la lignée myéloïde, la protéine cellulaire KAP1 peut également promouvoir la dégradation de Tat par le protéasome, ce qui inhibe la transcription virale [100].

En résumé, la protéine virale Tat participe à la transactivation du promoteur du VIH, une étape essentielle à l'expression des gènes viraux. De plus, elle est impliquée dans l'établissement de la latence du VIH, puisque les niveaux d'expression de la protéine vont influencer l'entrée ou la sortie de la latence du virus. En effet, dans les cellules infectées par un virus latent, les niveaux de Tat sont plus faibles que dans les cellules infectées par un virus productif [101] et la surexpression de Tat dans ces cellules mène à la réactivation du virus latent [102-104]. Pour ces raisons, cette protéine est beaucoup étudiée pour bloquer et verrouiller le virus dans une forme de latence profonde. À ce jour, plusieurs molécules sont à l'étude pour interférer avec la transactivation par Tat.

Induction de la latence profonde

Plusieurs stratégies sont envisagées pour prévenir la transactivation du VIH par Tat. Certaines molécules visent à empêcher l'assemblage du complexe TAR-Tat-P-TEFb en interférant avec la liaison de Tat à TAR ou de Tat à CycT1 alors que d'autres composés ciblent la protéine virale Tat de manière plus spécifique. Les molécules citées dans cette partie ainsi que leur mode d'action sont résumées dans le *tableau 1*.

Cibler l'assemblage de TAR-Tat- P-TEFb

On peut cibler l'assemblage du complexe TAR-Tat-P-TEFb en inhibant l'interaction de Tat et de l'ARN TAR ou en inhibant celle entre Tat et P-TEFb. Tout d'abord, nous allons présenter les méthodes récentes envisagées pour perturber l'interaction Tat-TAR. Puis, nous présenterons les molécules développées actuellement pour prévenir l'interaction Tat-P-TEFb.

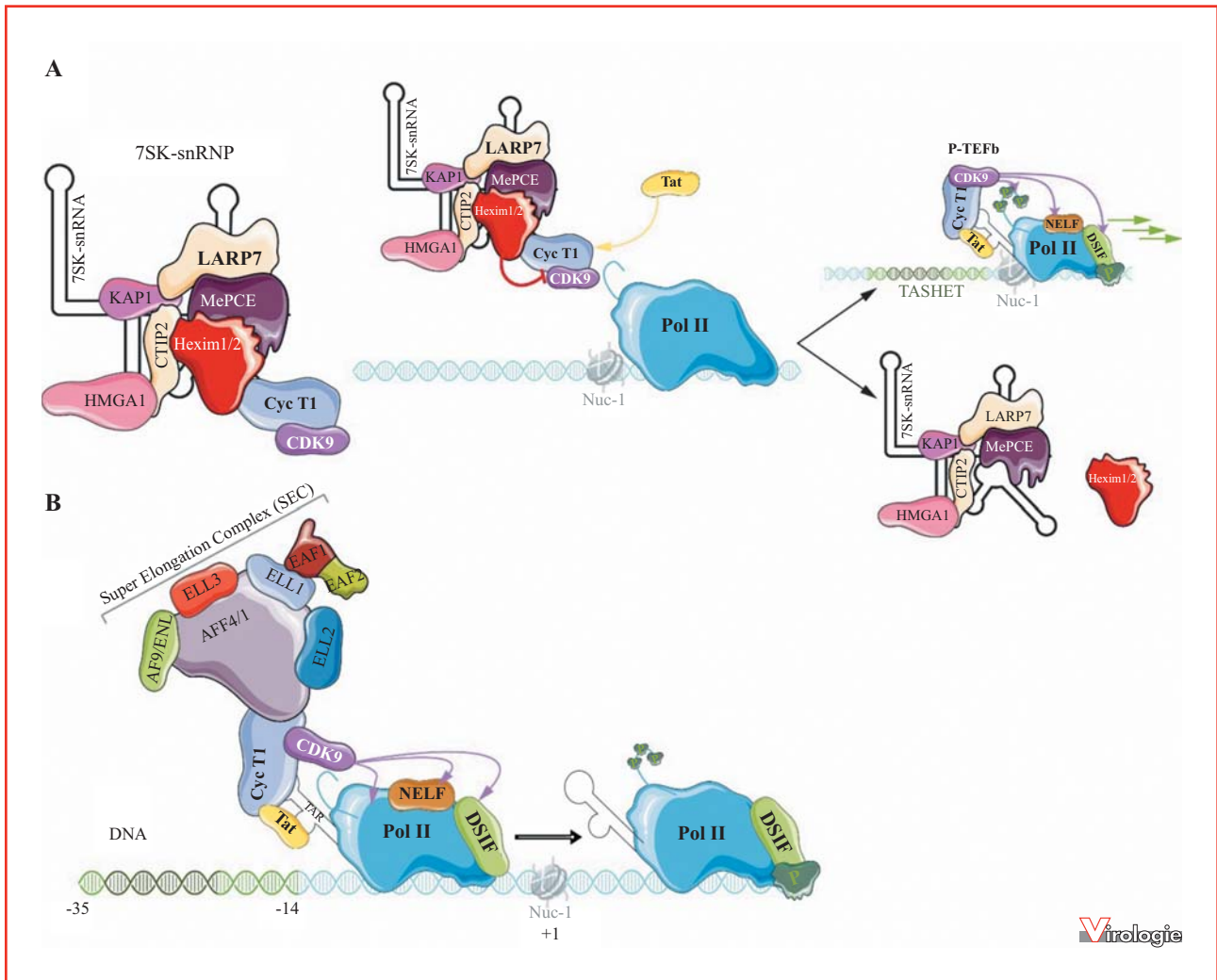


Figure 3. Rôle de tat dans la transcription. (A) Le complexe 7SK-snRNP permet la séquestration du complexe P-TEFb [Cycline T1 (CycT1) + CDK9] sous forme inactive. Ce dernier est composé de l'ARN 7SK sur lequel se lient les protéines HEXIM1/2, LARP7 et MePCE. L'interaction de HEXIM1/2 avec CycT1 entraîne la séquestration du complexe P-TEFb par 7SK-snRNP, ainsi que l'inhibition de l'activité kinase de CDK9 par HEXIM1/2. KAP1 ou HMGAI peuvent également recruter le complexe inactif au promoteur du VIH. D'autre part, le facteur CTIP2 est également associé au complexe P-TEFb inactif. Puisque la protéine virale Tat a une affinité plus forte pour CycT1 que HEXIM1/2, cela va mener à la dissociation de P-TEFb et 7SK-snRNP et au recrutement de P-TEFb au niveau du promoteur viral. (B) La Pol II transcrit l'ARN viral TAR qui recrute la protéine virale Tat. Tat libère ensuite P-TEFb et apporte ce complexe au niveau du promoteur. La liaison de P-TEFb entraîne, d'une part, la phosphorylation de la Pol II sur la Sérine 2 de sa queue CTD, ainsi que la phosphorylation de DSIF et NELF. Ces changements rendent la Pol II processive. D'autre part, P-TEFb interagit avec la protéine cellulaire AFF4/1, ce qui entraîne le recrutement du complexe de super élévation SEC au niveau du promoteur et participe à l'élongation active de la transcription.

La **didéhydrocortistatine A (dCA)** est un analogue de la cortistatine A. En 2012, l'équipe de Susana Valente a mis en évidence que cette molécule inhibe la réplication et l'activation du VIH dans des cellules humaines en empêchant l'interaction entre Tat et TAR [105]. Par la suite, les auteurs ont démontré que la dCA interagit directement avec Tat en liant sa région basique, ce qui entraîne une compétition avec l'ARN TAR pour ce site d'interaction (figure 4A) [106]. L'incubation des cellules avec un traitement

antirétroviral combiné à de la dCA mène également à des modifications épigénétiques dans le génome du VIH, ce qui diminue son taux de réplication et prévient sa réactivation par des LRA. En effet, en comparant des cellules qui ont subi un traitement antirétroviral combiné à de la dCA et des cellules qui ont reçu uniquement des molécules antirétrovirales, on observe chez les premières une diminution de l'occupation de la Pol II au niveau du promoteur et dans l'ensemble du génome des provirus intégrés dans

Tableau 1 Les différentes stratégies de blocage et verrouillage et leur mode d'action.

Cible	Molécule	Mécanisme d'action	Références
Assemblage de TAR-Tat-P-TEFb	Didéhydrocortistatine A (dCA)	Liaison de la dCA au domaine basique de Tat, ce qui empêche la liaison de l'ARN TAR [124]	[106, 108-110]
	Cycloaddition	Création de molécules empêchant la liaison de l'ARN TAR à Tat	[111]
	HT1	Dominant négatif de HEXIM1 qui séquestre P-TEFb	[112]
	CycT1-U7	Dominant négatif de Cyclin T1 (CycT1) qui pourrait former un complexe avec Tat et entraîner sa dégradation par le protéasome	[113]
Tat	Tat nullbasic	Mutant de la protéine Tat	[115, 116]
	Triptolide	Liaison de la région N-terminale de Tat, entraîne la dégradation de la protéine virale par le protéasome	[125]
Initiation de la transcription	Spirolactone	Cible la sous-unité XPB de TFIIF et mène à sa dégradation	[129, 131]
Élongation de la transcription	Inhibiteurs de CDK9	Inhibiteur de l'activité kinase de CDK9	[132]
	Curaxine (CBL0100)	Inhibiteur de FACT (<i>FAcilitate Chromatin Transcription</i>)	[133]
	Q308	Inhibiteur de FACT	[134]
Autres facteurs de transcription	Bengamide A	Inhibiteur de la transcription virale dépendante de NF- κ B	[136]
Maturation des ARNm	ABX464	Modulateur positif de l'épissage	[139, 140]
Promoteur viral	siRNA Prom-A et 143	siRNAs ciblant les répétitions en tandem NF- κ B dans le promoteur du VIH	[142-144]

les cellules [107]. Ces résultats sont associés à une augmentation de la formation de l'hétérochromatine et à une diminution des marqueurs épigénétiques de transcription active au niveau du promoteur du VIH [107]. L'impact de la dCA sur le rebond viral observé à la suite de l'interruption des traitements a ensuite été testé *in vivo* dans des modèles de souris humanisées infectées par le VIH. Dans cette étude, la prise de dCA retarde le rebond viral de neuf jours en moyenne [107]. La dCA est donc un candidat prometteur pour établir des stratégies de blocage et verrouillage, cependant elle n'a pas encore été testée en essais cliniques. De plus, des études *in vitro* suggèrent que le traitement de lignées cellulaires à long terme avec la dCA pourrait engendrer des mutations dans le génome viral qui confèreraient une résistance à ce dernier [109]. Les variants résultant de ces mutations ont une transcription basale augmentée, associée à un plus grand recrutement de la Pol II sur le génome proviral. Cette expression plus élevée des gènes viraux provoque néanmoins une reconnaissance accrue

des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques *in vitro*.

Des études *in vivo* sur une plus longue période sont donc nécessaires afin d'évaluer l'impact du traitement à long terme de la dCA. Dans une étude de 2019, la dCA inhibe la réplication du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) *in vitro* de la même façon que sur le VIH, en bloquant l'interaction entre Tat et TAR [110]. Ces résultats pourraient permettre de tester la dCA en étude préclinique dans un modèle simien.

Récemment, une étude a mis en évidence une **méthode chimique** qui pourrait permettre de **développer de nouveaux inhibiteurs de l'interaction Tat-TAR**. Dans cet article, les auteurs ont incubé l'ARN TAR portant une étiquette biotine avec des blocs alkynes et azides en construction [111]. Ces blocs ont subi un processus de cycloaddition, une réaction chimique menant à la formation d'un triazole, une molécule stable en condition de stress réductif ou oxydatif ainsi que d'hydrolyse acide ou basique. Une chromatogra-

phie d'affinité, utilisant des billes magnétiques recouvertes de streptavidine qui reconnaît l'étiquette biotine de l'ARN TAR, a ensuite permis de séparer les triazoles capables d'interagir avec l'ARN TAR. Les différentes molécules obtenues ont ensuite été testées pour leur capacité à inhiber la liaison de Tat à l'ARN TAR et deux des trois produits obtenus étaient capables de prévenir la liaison *in vitro* (figure 4A) [111]. En outre, ces molécules avaient une spécificité de liaison à l'ARN TAR. Des études plus approfondies sont nécessaires pour évaluer l'impact de ces inhibiteurs sur la transcription virale.

Ces deux stratégies, le traitement à la dCA ainsi que la création d'inhibiteurs de l'interaction Tat-TAR par cycloaddition, représentent les progrès récents effectués pour perturber l'interaction Tat-TAR. À présent, nous allons présenter les méthodes développées pour inhiber l'interaction Tat-P-TEFb.

HT1 est une protéine chimère composée des acides aminés 150-220 de HEXIM1 et du domaine arginine de Tat [112]. Elle agit comme un peptide dominant négatif de la protéine HEXIM1 et entraîne une diminution de la transactivation par Tat de la Pol II en entrant en compétition avec Tat pour la liaison de P-TEFb et en inhibant l'activité kinase de CDK9 (figure 4A). Le résultat est une diminution de la formation et de la disponibilité de ce complexe essentiel à la transactivation pour le virus. L'expression stable de HT1 dans des lignées cellulaires infectées par le VIH inhibe la réplication et la réactivation du virus à la suite de la stimulation par des LRA [112].

Il existe également une molécule **dominante négative de la protéine cellulaire CycT1**, il s'agit de **CycT1-U7**. L'identification des groupes d'acides aminés les plus conservés dans la partie N-terminale de CycT1, qui est la partie requise pour la transactivation, ainsi que l'introduction de mutations dans ces séquences a permis la production de protéines. L'impact de ces protéines sur l'expression des gènes viraux a permis de sélectionner CycT1-U7 qui a un impact négatif sur la transcription. *In vitro*, ce traitement entraîne une diminution de la transactivation du promoteur viral, ainsi qu'une dégradation de la protéine virale Tat [113]. Les auteurs ont émis l'hypothèse que CycT1-U7 forme un complexe avec Tat, ce qui va déclencher sa dégradation par le protéasome puisque l'incubation des cellules avec un inhibiteur du protéasome rétablit les niveaux de Tat dans la cellule (figure 4A).

Cibler Tat

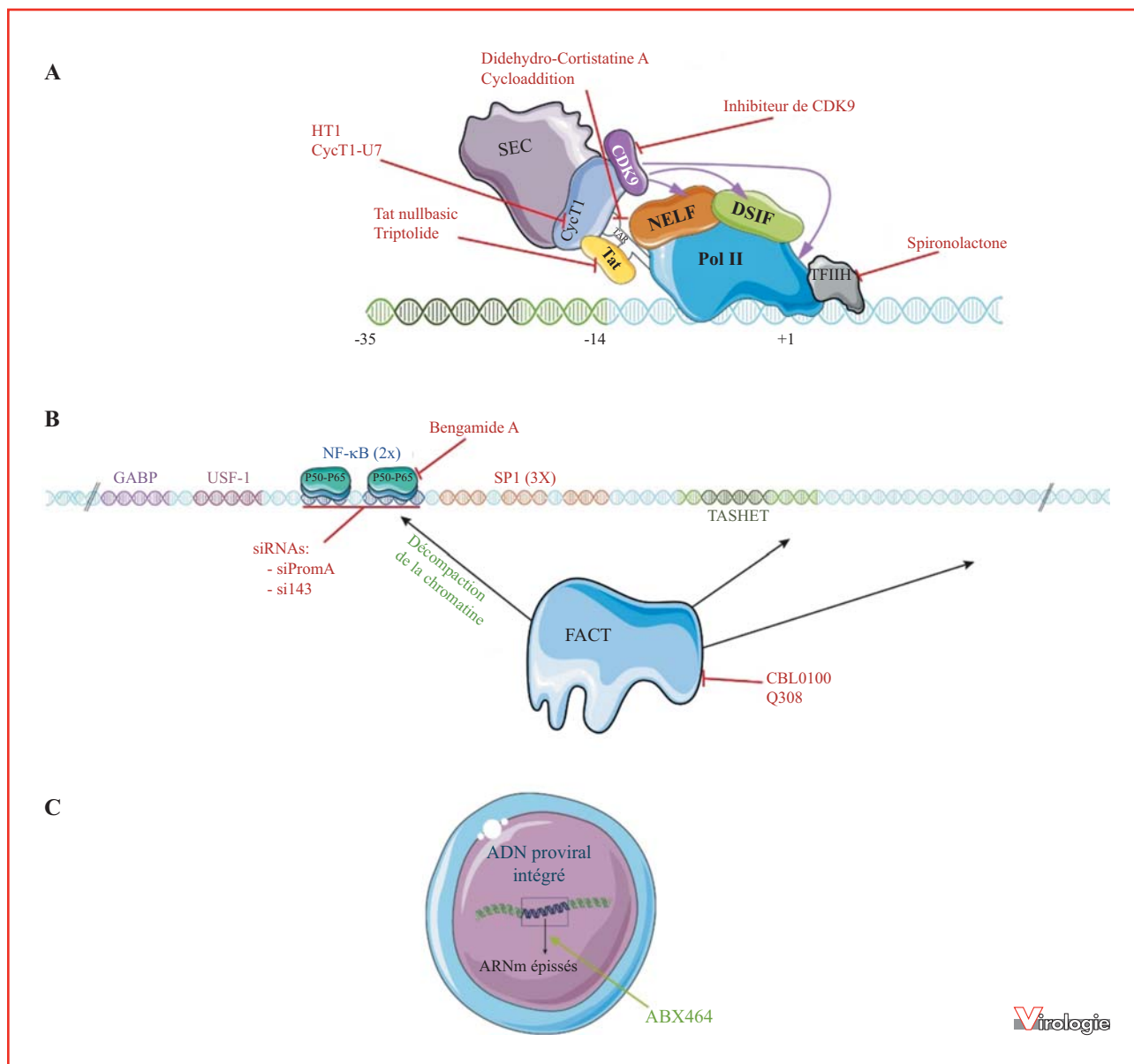
D'autres stratégies d'induction de la latence profonde ciblent uniquement la protéine virale Tat, telle que la protéine Tat nullbasic ou le triptolide.

La protéine **Tat nullbasic** est un mutant de la protéine Tat-BH10 dans laquelle les acides aminés de la région riche en arginine ont été remplacés par des résidus glycines et alanines [114]. *In vitro*, cette protéine est capable d'inhiber la transactivation du promoteur du VIH par Tat (figure 4 A). L'expression stable de la protéine Tat nullbasic dans des cellules Jurkat infectées avec un virus pseudotypé du VIH permet d'inhiber la réplication virale et de prévenir la réactivation du provirus induite par un LRA [114]. Au niveau du promoteur viral, le traitement induit une diminution de l'occupation de la Pol II et une diminution des marques épigénétiques liées à une région de transcription active telle que H3K9ac. De plus, il n'a pas d'effet sur les gènes cellulaires, ce qui démontre sa spécificité [115].

Testé *in vivo* en pré- ou post-infection dans des souris NSG (*NOD Scid Gamma*) reconstituées avec de la moelle osseuse humaine préalablement infectée avec le VIH, le traitement avec la protéine Tat nullbasic entraîne une diminution des ARNm viraux ainsi qu'une augmentation des niveaux de cellules T CD4⁺ par rapport au traitement contrôle [116]. Si ces données sont prometteuses, des données plus approfondies sur l'impact de ce traitement sur la santé des souris sont nécessaires. En effet, l'expression et la sécrétion de la protéine virale Tat par les cellules infectées est associée à une hyperactivation immunitaire [117] ainsi qu'à l'apoptose des cellules non infectées avoisinantes [118], notamment des lymphocytes T [119]. Tat est également une protéine neurotoxique [120] capable de traverser la barrière hémato-encéphalique [121]. Cette perméabilité est associée à des dommages dans les tissus cérébraux [122], du fait de l'induction de la production de cytokines [122, 123] et de l'augmentation de l'expression de la synthase d'oxyde nitrique inductible [122, 124].

L'utilisation de Tat nullbasic pose également un autre défi, la livraison de la molécule aux cellules infectées. Dans l'étude *in vivo*, Tat nullbasic est introduit dans les cellules T CD4⁺ primaires humaines par transduction, puis les cellules sont infectées avec le VIH et finalement greffées à des souris NSG [116]. La possibilité d'utiliser des nanoparticules pour administrer la molécule chez les patients est notamment étudiée [116].

Il est également possible de cibler la protéine virale Tat avec le **triptolide**, un diperténolide époxyde isolé de *Tripterygium wilfordii* Hoof F. Un criblage de plus de 200 composés naturels purifiés, dont le but était d'évaluer leur impact sur la réplication du virus pseudotypé du VIH *in vitro*, a permis d'identifier cette molécule [125]. À faible concentration, le triptolide réduit l'expression des gènes viraux sans affecter la viabilité de lignées cellulaires et de cellules primaires infectées. Le triptolide peut reconnaître la région N-terminale de Tat, ce qui va occasionner la dégradation de la protéine virale par le protéasome (figure 4A).



Virologie

Figure 4. Molécules pour bloquer et verrouiller l'expression du VIH. (A) Pour empêcher la transcription des gènes du VIH, certaines molécules vont perturber l'interaction Tat-TAR, telles que la dCA (didehydrocortistatine A) ou les molécules formées par cycloaddition. D'autres vont cibler Tat uniquement tels que le triptolide ou Tat nullbasic. D'autres molécules vont interférer avec la liaison de Tat avec P-TEFb, comme HT1 et CycT1-U7. Finalement, il est également possible d'utiliser des molécules inhibitrices de l'activité de CDK9 ou de cibler TFIIF avec la spironolactone. (B) FACT (*FA*cilitate *CH*romatin *T*ranscription) est un complexe protéique cellulaire induisant des modifications épigénétiques associées à la décompaction de la chromatine. Les molécules CBL0100 et Q308 vont entraîner l'inhibition ou la dégradation de FACT respectivement, ce qui a pour conséquences une diminution de l'occupation de FACT et de la Pol II au niveau du promoteur viral, donc une diminution de l'expression des gènes viraux. La bengamide A interfère avec la signalisation de NF-κB. Les siRNA siPromA et si143 ciblent les répétitions NF-κB en tandem dans le promoteur du VIH, entraînant une diminution de la transcription des gènes du VIH. (C) ABX464 favorise l'épissage des ARNm viraux, diminuant ainsi la disponibilité des ARNm de pleine taille nécessaires à la production de virions.

La dégradation de Tat va empêcher la transactivation du promoteur du VIH et la transcription virale sera donc diminuée [125].

Le triptolide est un candidat intéressant, néanmoins il ne peut pas encore être utilisé en essai clinique à cause de sa toxicité. En effet, des études *in vivo* dans différents modèles animaux ont mis en évidence une cytotoxicité du triptolide au niveau du foie [125], des reins [127], et du système reproductif [128]. Des solutions sont envisagées afin de diminuer cette toxicité, notamment celle de modifier la structure chimique du produit ou de combiner le triptolide avec d'autres traitements. Toutefois, ces solutions n'ont pas encore été testées dans le cadre d'études visant à cibler le VIH et la protéine virale Tat.

En résumé, puisqu'elle est très importante à la transcription et la réplication du VIH, beaucoup de stratégies pour bloquer et verrouiller le virus ciblent des mécanismes en lien avec la protéine virale Tat. Cependant, d'autres approches indépendantes de cette protéine sont aussi en développement. Il est notamment envisagé de perturber les étapes de la transcription telles que l'initiation et l'élongation en ciblant les protéines cellulaires impliquées dans ces phases.

Cibler l'initiation de la transcription

La **spironolactone** est un inhibiteur potentiel de l'initiation de la transcription des gènes du VIH [129]. La spironolactone est un bloqueur d'androgène également connu comme inhibiteur de TFIID, un facteur impliqué dans l'initiation de la transcription. Cette molécule induit la dégradation rapide et réversible de la sous-unité XPB de TFIID par le protéasome (*figure 4A*) [130]. *In vitro*, le traitement à la spironolactone entraîne une diminution de la transcription du VIH dépendante de Tat dans des lignées de cellules T CD4⁺ [129]. Cette molécule permet en outre de prévenir la réactivation du virus latent induite par des LRA dans des lignées de cellules T CD4⁺ ainsi que dans des cellules T CD4⁺ primaires. Cependant, le traitement à long terme des cellules avec la spironolactone n'empêche pas le rebond viral observé à la suite de l'interruption des traitements antirétroviraux [131].

Cibler l'élongation de la transcription

En ce qui concerne l'élongation de la transcription, il est possible d'inhiber l'activité de la kinase CDK9 avec des flavones synthétiques ou des inhibiteurs de CDK9 tels que le **flavopiridol** ou l'**atuveciclib** (*figure 4A*). *In vitro*, ces deux molécules suppriment la réplication du VIH dans des cellules mononucléées du sang humain et préviennent la réactivation virale induite par des LRA [132]. Elles permettent également de retarder le rebond viral observé suite à l'arrêt des traitements antirétroviraux. Des études plus

approfondies sont requises pour évaluer l'effet de ces molécules sur la réplication virale *in vivo*, ainsi que leur toxicité.

La **curaxine** ou **CBL0100** pourrait aussi bloquer l'élongation de la transcription [133]. CBL0100 est un inhibiteur du complexe FACT (*FA*cilitate *Chromatin Transcription*), un complexe protéique assurant des marques épigénétiques associées à la décompaction de la chromatine. CBL0100 diminue l'occupation de ce complexe et de la Pol II au niveau du promoteur du VIH, ce qui entraîne une diminution de la transcription virale (*figure 4B*). Cette molécule permet *in vitro* de réduire la réplication du VIH dans des cellules primaires, ainsi que d'inhiber la réactivation du provirus dans des lignées de cellules latentes traitées avec des LRA [133].

Finalement, la petite molécule **Q308** conduit à la dégradation de FACT et de Tat par le protéasome (*figure 4B*) [134]. Tout comme CBL0100, Q308 inhibe la transcription des gènes du VIH ainsi que la réactivation du virus *in vitro* et mène à une diminution de l'occupation de FACT et de la Pol II au niveau du promoteur viral. De plus, cette molécule provoque, *in vitro*, une apoptose préférentielle des lignées cellulaires avec une infection chronique du VIH, ce qui suggère qu'elle pourrait permettre de diminuer la taille du réservoir viral [134]. Des études *in vivo* sont cependant nécessaires pour évaluer l'effet véritable de Q308 sur la latence et le réservoir viral.

Cibler d'autres facteurs de transcription

Si les molécules citées précédemment sont destinées à perturber la transcription dépendante de Tat, il est possible d'intervenir sur la transcription impliquant d'autres facteurs. Par exemple, la **bengamide A** est un inhibiteur de la signalisation par NF-κB (*figure 4B*) [135]. Un criblage de plus de 250 composés issus d'invertébrés et de microorganismes marins a mis en évidence l'effet inhibiteur de cette molécule sur la transcription des gènes du VIH. En effet, le traitement de cellules infectées par un virus pseudotypé du VIH-1 avec de la bengamide A diminue l'expression des gènes viraux d'une manière dépendante de NF-κB [136]. *In vitro*, cette molécule n'exhibe pas d'effet cytotoxique sur les cellules, cependant des analyses *in vivo* seront nécessaires pour appréhender l'impact de la bengamide A sur l'expression des gènes du VIH ainsi que ses effets secondaires potentiels.

Cibler la maturation des ARNm

De même que la transcription, la maturation des ARN messagers viraux est une cible potentielle pour maintenir le virus en latence. En effet, la molécule **ABX464**, développée à partir du dérivé indole IDC16, possède une activité antivirale, associée à un rôle de modulateur de l'épissage (*figure 4C*) [137,138]. Le potentiel antiviral de ABX464 a

été testé dans des cellules mononucléées du sang humain issues de personnes saines, qui ont ensuite été infectées avec des virus pseudotypés du VIH issus de différentes souches virales [138]. Cette étude a permis de démontrer que ABX464 engendre une diminution de la réplication du VIH dans des cellules primaires. Cette diminution est dépendante de la dose, elle est efficace sur plusieurs souches virales et il n'y a pas d'apparition de résistance au traitement jusqu'à 24 semaines à partir du début. De plus, les auteurs ont montré que ABX464 n'est pas génotoxique. Le mécanisme d'action de ABX464 a montré que cette molécule favorise les phénomènes d'épissage ce qui diminue la disponibilité des ARNm viraux de pleine taille requis pour l'encapsidation et la formation de virions [139]. L'action de ABX464 est spécifique aux ARNm viraux et il n'y a pas de conséquences sur l'épissage cellulaire [140]. Testée *in vivo*, cette molécule permet, dans des modèles de souris humanisées infectées avec le VIH, de réduire la charge virale et de ralentir le rebond viral suite à l'interruption des traitements [139].

Les résultats d'un essai clinique de phase IIa sur des patients sous traitement antirétroviral avec une charge virale supprimée ayant reçu une dose journalière de ABX464 pendant un mois ont montré une diminution de l'ADN total et de l'initiation de la transcription, mais aucune différence significative concernant les ARN polyadénylés et les ARN épissés [141].

Cibler le promoteur viral

Finalement, il est possible de cibler le promoteur viral par interférence à l'ARN à l'aide de petits ARN interférents (siRNA pour *small interfering RNA*). Deux siRNA ciblant les motifs NF- κ B en tandem dans le promoteur du VIH, nommés **siProm-A** et **si143**, permettent de réduire la transcription virale (*figure 4B*) [142, 143]. Ces siRNAs agissent en augmentant le recrutement des protéines Argonaute-1 et HDAC1 et favorisent la formation de l'hétérochromatine, ce qui mène à une diminution de l'expression des gènes viraux [142-144].

À ce jour, ces molécules n'ont pas été testées *in vivo*, il est donc difficile d'évaluer leur potentiel en tant que traitement antiviral. Le défi actuel est de trouver un moyen d'acheminer ces siRNAs dans l'organisme et plusieurs stratégies sont analysées en essais cliniques [145, 146].

Futurs développements

Pour conclure, les stratégies de blocage et verrouillage sont encore à l'étude et des analyses à long terme, en essai clinique, de leur impact sur la réplication virale seront nécessaires pour évaluer leur potentiel thérapeutique. Ces stratégies sont néanmoins prometteuses, et de nouvelles cibles thérapeutiques sont identifiées régulièrement, ce qui

permettra de développer d'autres molécules pour bloquer et verrouiller le VIH dans un état latent.

Conclusion

En résumé, de nombreuses molécules sont actuellement à l'étude pour développer la stratégie de blocage et verrouillage. Qu'elles ciblent Tat ou les autres protéines requises pour l'expression des gènes viraux, l'identification des mécanismes et des protéines impliqués dans la transcription des gènes du VIH a permis leur développement. Ces études sont d'autant plus importantes que les résultats d'essais cliniques de molécules associées aux stratégies de réactivation et élimination se sont révélés décevants. Les études actuelles ainsi que des revues publiées récemment sont le reflet d'un intérêt grandissant pour le développement de l'approche de blocage et verrouillage, intérêt partagé par notre laboratoire.

L'avantage principal de la stratégie de blocage et verrouillage serait la possibilité d'espacer les traitements, contrairement aux antirétroviraux actuels qui nécessitent une prise quotidienne, puisque le but des molécules développées pour cette stratégie est de contenir le rebond viral à plus long terme. Par exemple, testée *in vivo*, la dCA permet de retarder le rebond viral jusqu'à 19 jours après l'interruption des traitements [108]. C'est un avantage non négligeable, puisque la contrainte actuelle de prendre les antirétroviraux chaque jour, parfois plusieurs fois par jour, affecte l'assiduité des patients à ce traitement [147]. Une stratégie pour bloquer et verrouiller le VIH pourrait donc être considérée comme une rémission, plutôt qu'une guérison définitive, si elle permettait d'améliorer la qualité de vie des patients en prolongeant le temps entre les traitements de quelques mois. Idéalement, cette approche permettrait une guérison fonctionnelle, mais actuellement, sa faisabilité n'a pas été testée dans des essais cliniques. Or, le fait que 8 % du génome humain soit constitué de séquences de rétrovirus endogènes dont l'expression est éteinte ou régulée par la cellule [148] suggère que la cellule est dotée de mécanismes pouvant réprimer l'expression des rétrovirus. De ce fait, la recherche de nouvelles molécules pouvant induire un état de latence profonde du VIH a une haute valeur stratégique dans la quête d'une guérison du VIH.

Malgré ses avantages et les progrès effectués au cours des dernières années, l'approche blocage et verrouillage présente quelques défis. Ces défis sont notamment liés à l'hétérogénéité et à l'étendue du réservoir viral, mises en évidence lors des essais menés pour la stratégie réactivation et élimination [149]. En effet, on peut se demander s'il sera possible de cibler spécifiquement les cellules infectées avec un virus latent avec ces molécules sans affecter

les cellules avoisinantes. Cette considération est moindre pour les approches ciblant des facteurs spécifiques au virus comme Tat, mais est particulièrement importante en ce qui concerne les molécules développées pour cibler CDK9, CycT1 ou NF-κB. Puisque ces protéines sont impliquées dans des voies de signalisation cellulaire, il existe un risque de perturber l'équilibre des cellules et d'entraîner des effets secondaires. Pour limiter ces effets secondaires, il faudra se concentrer sur des facteurs qui contrôlent l'expression, mais dont la fonction n'est pas essentielle pour la viabilité des cellules infectées. Une compréhension approfondie des mécanismes régissant la transcription reste une priorité pour pouvoir identifier des petites molécules capables de bloquer l'expression du VIH avec une spécificité qui permettra une application clinique. Plusieurs équipes, dont la nôtre, travaillent actuellement en ce sens.

Finalement, l'utilisation de ces molécules en thérapie nécessitera un suivi méticuleux de l'état verrouillé du virus. La surveillance de l'état dormant et du réservoir viral pourrait être effectuée grâce à des techniques développées récemment appelées DNA et RNAScope, qui permettent de détecter l'ADN intégré ainsi que l'ARN par hybridation in situ avec une résolution cellulaire [12, 150]. Ces technologies, combinées à une mesure régulière de la charge virale [151], pourraient permettre de suivre le réservoir viral et d'évaluer le risque de rebond.

Remerciements. La recherche sur une guérison du VIH dans notre laboratoire a été soutenue par une subvention des Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC). Nous remercions le programme « RNA Innovation » pour une bourse de doctorat octroyée à M. Da Rocha et le Conseil de recherche national (CRSNG) pour une bourse recherche du 1^{er} cycle octroyée à B. Bonham. Nous voulons remercier Smart-Servier (<https://smart.servier.com>) et brgfx/Freepik (<https://www.freepik.com>) pour les ressources graphiques qui ont permis de monter et créer nos figures.

L'accès libre de cette revue est financé par le réseau SIDA & Maladies infectieuses du Fonds de recherche du Québec en santé.

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Montaner JSG, Lima VD, Harrigan PR, *et al.* Expansion of HAART coverage is associated with sustained decreases in HIV/AIDS morbidity, mortality and hiv transmission: the "HIV treatment as prevention" experience in a Canadian setting. *PLoS One* 2014; 9: e87872.
2. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, *et al.* Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999; 5: 1-6.
3. Chavez L, Calvanese V, Verdin E. HIV latency is established directly and early in both resting and activated primary CD4 T cells. *PLoS Pathog* 2015; 11(6): e1004955.

4. Bouchat S, van Lint C. Viral latency of HIV-1. *Virologie* 2019; 23: 195-210.
5. Davey RT, Bhat N, Yoder C, *et al.* HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 15109-14.
6. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, *et al.* HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 2009; 15: 893-900.
7. Espinosa Ortiz A, Modica A, Fromentin R, Chomont N. Immunological mechanisms involved in the persistence of HIV reservoirs. *Virologie* 2022; 26(1): 9-22.
8. Lambotte O, Taoufik Y, de Goër MG, Wallon C, Goujard C, Delfraissy JF. Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23: 114-9.
9. Cattin A, Salinas TRW, Gosselin A, *et al.* HIV-1 is rarely detected in blood and colon myeloid cells during viral-suppressive antiretroviral therapy. *AIDS* 2019; 33: 1293-306.
10. Wong ME, Jaworowski A, Hearn AC. The HIV reservoir in monocytes and macrophages. *Front Immun* 2019; 10: 1435.
11. Varatharajan L, Thomas SA. The transport of anti-HIV drugs across blood-CNS interfaces: Summary of current knowledge and recommendations for further research. *Antiviral Res* 2009; 82: 99-109.
12. Estes JD, Kityo C, Ssali F, *et al.* Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies. *Nat Med* 2017; 23: 1271-6.
13. Jenabian MA, Costiniuk CT, Mehraj V, *et al.* Immune tolerance properties of the testicular tissue as a viral sanctuary site in ART-treated HIV-infected adults. *AIDS* 2016; 30: 2777-86.
14. Thomas SA, Segal MB. The transport of the anti-HIV drug, 2',3'-dideohydro-3'-deoxythymidine (D4T), across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 49-54.
15. Deeks SG. Shock and kill. *Nature* 2012; 487: 439-40.
16. Edelstein LC, Micheva-Viteva S, Phelan BD, Dougherty JP. Short communication: Activation of latent HIV type 1 gene expression by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), an HDAC inhibitor approved for use to treat cutaneous T cell lymphoma. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; 25: 883-7.
17. Banga R, Procopio FA, Cavassini M, Perreau M. *In vitro* reactivation of replication-competent and infectious HIV-1 by histone deacetylase inhibitors. *J Virol* 2016; 90: 1858-71.
18. Elliott JH, Wightman F, Solomon A, *et al.* Activation of HIV transcription with short-course vorinostat in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog* 2014; 10(10): e1004473.
19. Abner E, Jordan A. HIV "shock and kill" therapy: in need of revision. *Antiviral Res* 2019; 166: 19-34.
20. Grau-Expósito J, Luque-Ballesteros L, Navarro J, *et al.* Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4+ T subpopulations. *PLOS Pathog* 2019; 15: e1007991.
21. Yukl SA, Kaiser P, Kim P, *et al.* HIV latency in isolated patient CD4+ T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing. *Sci Transl Med* 2018; 10: eaap9927.
22. Bouchat S, Delacourt N, Kula A, *et al.* Sequential treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and deacetylase inhibitors reactivates HIV-1. *EMBO Mol Med* 2016; 8: 117-38.
23. Scarlata S, Carter C. Role of HIV-1 gag domains in viral assembly. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1614: 62-72.

24. Huarte N, Carravilla P, Cruz A, *et al.* Functional organization of the HIV lipid envelope. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 34190.
25. Blissenbach M, Grewe B, Hoffmann B, Brandt S, Überla K. Nuclear RNA export and packaging functions of HIV-1 rev revisited. *J Virol* 2010 ; 84 : 6598-604.
26. Schulze-Gahmen U, Echeverria I, Stjepanovic G, *et al.* Insights into HIV-1 proviral transcription from integrative structure and dynamics of the Tat:AFF4:P-TEFb:TAR complex. *eLIFE* 2016 ; 5 : e15910.
27. Xiao H, Lis JT, Jeang K-T. Promoter activity of Tat at steps subsequent to TATA-binding protein recruitment. *Mol Cell Biol* 1997 ; 17 : 6898-905.
28. Li G, de Clercq E. HIV genome-wide protein associations: a review of 30 years of research. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016 ; 80 : 679-731.
29. Ren X, Park SY, Bonifacino JS, Hurley JH. How HIV-1 Nef hijacks the AP-2 clathrin adaptor to downregulate CD4. *eLife* 2014 ; 3 : e01754.
30. Simon JH, Sheehy AM, Carpenter EA, Fouchier RAM, Malim MH. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 vif protein. *J Virol* 1999 ; 73 : 2675-81.
31. Höglund S, Öhagen A, Lawrence K, Gabuzda D. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* 1994 ; 201 : 349-55.
32. Goh WC, Rogel ME, Kinsey M, *et al.* HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle a mechanism for selection of Vpr *in vivo*. *Nat Med* 1998 ; 4 : 65-71.
33. Manganaro L, de Castro E, Maestre AM, *et al.* HIV Vpu interferes with NF- κ B activity but not with interferon regulatory factor 3. *J Virol* 2015 ; 89 : 9781-90.
34. Neil SJD, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* 2006 ; 2 : 354-67.
35. Moron-Lopez S, Telwatte S, Sarabia I, *et al.* Human splice factors contribute to latent HIV infection in primary cell models and blood CD4+ T cells from ART-treated individuals. *PLoS Pathog* 2020 ; 16 : e1009060.
36. Li Z, Hajian C, Greene WC. Identification of unrecognized host factors promoting HIV-1 latency. *PLoS Pathog* 2020 ; 16 : e1009055.
37. Khoury G, Lee MY, Ramarathinam SH, *et al.* The RNA-binding proteins SRP14 and HMGB3 control HIV-1 Tat mRNA processing and translation during HIV-1 latency. *Front Genet* 2021 ; 12 : 680725.
38. Churchill MJ, Deeks SG, Margolis DM, Siliciano RF, Swanstrom R. HIV reservoirs: what, where and how to target them. *Nat Rev Microbiol* 2015 ; 14 : 55-60.
39. Castro-Gonzalez S, Colomer-Lluch M, Serra-Moreno R. Barriers for HIV cure: the latent reservoir. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2018 ; 34 : 739-59.
40. Mzingwane ML, Tiemessen CT. Mechanisms of HIV persistence in HIV reservoirs. *Rev Med Virol* 2017 ; 27 : e1924.
41. Wilhelm E, Bell B. Selective recognition of viral promoters by host cell transcription complexes: challenges and opportunities to control latency. *Curr Opin Virol* 2013 ; 3 : 380-6.
42. Luo Z, Lin C, Guest E, *et al.* The super elongation complex family of RNA polymerase II elongation factors: gene target specificity and transcriptional output. *Mol Cell Biol* 2012 ; 32 : 2608-17.
43. Malcolm T, Kam J, Pour PS, Sadowski I. Specific interaction of TFII-I with an upstream element on the HIV-1 LTR regulates induction of latent provirus. *FEBS Letters* 2008 ; 582 : 3903-8.
44. Schier AC, Taatjes DJ. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Genes Dev* 2020 ; 34 : 465-88.
45. Harrich D, Garcia J, Wu F, Mitsuyasu R, Gonzalez J, Gaynor R. Role of SP1-binding domains in *in vivo* transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* 1989 ; 63 : 2585-91.
46. Jones KA, Kadonaga JT, Luciw PA, Tjian R. Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* 1989 ; 232 : 755-9.
47. Gidoni D, Dynan WS, Tjian R. Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. *Nature* 1984 ; 312 : 409-13.
48. Parrott C, Seidner T, Duh E, *et al.* Variable role of the long terminal repeat Spl-binding sites in human immunodeficiency virus replication in T lymphocytes. *J Virol* 1991 ; 65 : 1414-9.
49. Tan NY, Khachigian LM. Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* 2009 ; 29 : 2483-8.
50. Marban C, Suzanne S, Dequiedt F, *et al.* Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing. *EMBO J* 2007 ; 26 : 412-23.
51. Sadowski I, Lourenco P, Malcolm T. Factors controlling chromatin organization and nucleosome positioning for establishment and maintenance of HIV latency. *Curr HIV Res* 2008 ; 6 : 286-95.
52. Forouzanfar F, Ali S, Wallet C, *et al.* HIV-1 Vpr mediates the depletion of the cellular repressor CTIP2 to counteract viral gene silencing. *Sci Rep* 2019 ; 9 : 13154.
53. Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006 ; 25 : 6680-4.
54. Chan JKL, Greene WC. NF- κ B/Rel: agonist and antagonist roles in HIV-1 latency. *Curr Opin HIV AIDS* 2011 ; 6 : 12-8.
55. Giffin MJ, Stroud JC, Bates DL, von Koenig KD, Hardin J, Chen L. Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR κ B element. *Nat Struct Mol Biol* 2003 ; 10 : 800-6.
56. Williams SA, Chen LF, Kwon H, Ruiz-Jarabo CM, Verdin E, Greene WC. NF- κ B p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J* 2006 ; 25 : 139-49.
57. Sadowski I, Mitchell DA. TFII-I and USF (RBF-2) regulate Ras/MAPK-responsive HIV-1 transcription in T cells. *Eur J Cancer* 2005 ; 41 : 2528-36.
58. Bell B, Sadowski I. Ras-responsiveness of the HIV-1 LTR requires RBF-1 and RBF-2 binding sites. *Oncogene* 1996 ; 13(12):2687-97.
59. Bernhard W, Barreto K, Raithatha S, Sadowski I. An Upstream YY1 binding site on the HIV-1 LTR contributes to latent infection. *PLoS One* 2013 ; 8(10): e77052.
60. Roebuck KA, Saifuddin M, Roebuck KA. Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Exp* 1999 ; 8 : 67-84.
61. Ne E, Palstra RJ, Mahmoudi T. Transcription: insights from the HIV-1 promoter. *Int Rev Cell Mol Biol* 2018 ; 335 : 191-243.
62. van Lint C, Bouchat S, Marcello A. HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* 2013 ; 10 : 67.
63. Lu X, Welsh TM, Matija Peterlin B. The human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat specifies two different transcription complexes, only one of which is regulated by Tat. *J Virol* 1993 ; 67(4): 1752-60.
64. Wilhelm E, Doyle MC, Nzaramba I, Magdzinski A, Dumais N, Bell B. CTGC motifs within the HIV core promoter specify Tat-responsive pre-initiation complexes. *Retrovirology* 2012 ; 9 : 62.
65. Joseph L, Kim L, Dimitar B, Nikolov B, Stephen K, Burley K. Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element. *Nature* 1993 ; 365 : 520-7.

66. Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol* 1994 ; 14 : 1582.
67. Kim Y, Geiger JH, Hahn S, Sigler PB. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex orientation and structure of the TATA box. *Nature* 1993 ; 365 : 512-20.
68. Malecová B, Gross P, Boyer-Guittaut M, Yavuz S, Oelgeschläger T. The initiator core promoter element antagonizes repression of TATA-directed transcription by negative cofactor NC2. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 24767-76.
69. Bryant GO, Martel LS, Burley SK, Berk AJ. Radical mutations reveal TATA-box binding protein surfaces required for activated transcription *in vivo*. *Genes Dev* 1996 ; 10 : 2491-504.
70. Kim TK, Zhao Y, Ge H, Bernstein R, Roeder RG. TATA-binding protein residues implicated in a functional interplay between negative cofactor NC2 (Dr1) and general factors TFIIA and TFIIB. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 10976-81.
71. Nakajima N, Horikoshi M, Roeder RG. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity, and TATA box-promoter interactions of TFIID. *Mol Cell Biol* 1988 ; 8 : 4028-40.
72. Blombach F, Smollett KL, Grohmann D, Werner F. Molecular mechanisms of transcription initiation - structure, function, and evolution of TFE/TFIIE-like factors and open complex formation. *J Mol Biol* 2016 ; 428 : 2592-606.
73. Rimel JK, Taatjes DJ. The essential and multifunctional TFIIF complex. *Protein Sci* 2018 ; 27 : 1018-37.
74. Guo J, Price DH. RNA polymerase II transcription elongation control. *Chem Rev* 2013 ; 113 : 8583-603.
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. Vos SM, Farnung L, Urlaub H, Cramer P. Structure of paused transcription complex Pol II-DSIF-NELF. *Nature* 2018 ; 560 : 601.
77. Bernecky C, Plitzko JM, Cramer P. Structure of a transcribing RNA polymerase II-DSIF complex reveals a multidentate DNA-RNA clamp. *Nat Struct Mol Biol* 2017 ; 24 : 809-15.
78. Fujinaga K, Irwin D, Huang Y, Taube R, Kurosu T, Peterlin BM. Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol* 2004 ; 24 : 787-95.
79. Yik JHN, Chen R, Nishimura R, Jennings JL, Link AJ, Zhou Q. Inhibition of P-TEFb (CDK9 /Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol Cell* 2003 ; 12 : 971-82.
80. Kobbi L, Demey-Thomas E, Braye F, *et al*. An evolutionary conserved Hexim1 peptide binds to the Cdk9 catalytic site to inhibit P-TEFb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 ; 113 : 12721-6.
81. Cherrier T, le Douce V, Eilebrecht S, *et al*. CTIP2 is a negative regulator of P-TEFb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 ; 110 : 12655-60.
82. Faust T, Frankel AD, D'Orso I. Transcription control by long non-coding RNAs. *Transcription* 2012 ; 3 : 78-86.
83. Eilebrecht S, le Douce V, Riclet R, *et al*. HMGA1 recruits CTIP2-repressed P-TEFb to the HIV-1 and cellular target promoters. *Nucleic Acids Res* 2014 ; 42 : 4962-71.
84. 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.
85. Eilebrecht S, le Douce V, Riclet R, *et al*. HMGA1 recruits CTIP2-repressed P-TEFb to the HIV-1 and cellular target promoters. *Nucleic Acids Res* 2014 ; 42 : 4962-71.
86. Barboric M, Nissen RM, Kanazawa S, Jabrane-Ferrat N, Matija Peterlin B, Hughes H. NF- κ B Binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 2001 ; 8 : 327-37.
87. Schuller R, Forné I, Straub T, *et al*. Heptad-specific phosphorylation of RNA polymerase II CTD. *Mol Cell* 2016 ; 61 : 305-14.
88. Ping YH, Rana TM. DSIF and NELF Interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 12951-8.
89. Tantale K, Garcia-Oliver E, Robert MC, *et al*. Stochastic pausing at latent HIV-1 promoters generates transcriptional bursting. *Nat Commun* 2021 ; 12 : 1-20.
90. Muesing MA, Smith DH, Capon DJ. Regulation of mRNA accumulation by a human Immunodeficiency virus trans-activator protein. *Cell* 1987 ; 48 : 691-701.
91. Aboul-Ela F, Karn J, Varani G. Structure of HIV-1 TAR RNA in the absence of ligands reveals a novel conformation of the trinucleotide bulge. *Nucleic Acids Res* 1996 ; 24 : 3974-81.
92. Feng S, Holland EC. HIV-1 Tat trans-activation requires the loop sequence within TAR. *C Mol Cell Biol* 1986 ; 261 : 283-90.
93. Sedore SC, Byers SA, Biglione S, Price JP, Maury WJ, Price DH. 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* 2007 ; 35 : 4347-58.
94. Barboric M, Yik JHN, Czudnochowski N, *et al*. Tat competes with HEXIM1 to increase the active pool of P-TEFb for HIV-1 transcription. *Nucleic Acids Res* 2012 ; 35 : 2003-12.
95. He N, Liu M, Hsu J, *et al*. HIV-1 Tat and host AFF4 recruit two transcription elongation factors into a bifunctional complex for coordinated activation of HIV-1 transcription. *Mol Cell* 2010 ; 38 : 428-38.
96. Lin C, Smith ER, Takahashi H, *et al*. AFF4, a component of the ELL/P-TEFb elongation complex and a shared subunit of MLL chimeras, can link transcription elongation to leukemia. *Mol Cell* 2010 ; 37 : 429-37.
97. Bisgrove DA, Mahmoudi T, Henklein P, Verdin E. Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 ; 104 : 13690-5.
98. D'Orso I, Frankel AD. RNA-mediated displacement of an inhibitory snRNP complex activates transcription elongation. *Nat Struct Mol Biol* 2010 ; 17 : 815-21.
99. 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.
100. Ait-Ammar A, Bellefroid M, Daouad F, *et al*. Inhibition of HIV-1 gene transcription by KAP1 in myeloid lineage. *Sci Rep* 2021 ; 11(1) : 2692.
101. Pearson R, Kim YK, Hokello J, *et al*. Epigenetic silencing of human immunodeficiency virus (HIV) transcription by formation of restrictive chromatin structures at the viral long terminal repeat drives the progressive entry of HIV into latency. *J Virol* 2008 ; 82 : 12291-303.
102. Donahue DA, Kuhl BD, Sloan RD, Wainberg MA. The viral protein Tat can inhibit the establishment of HIV-1 latency. *J Virol* 2012 ; 86 : 3253-63.
103. Razoooky BS, Pai A, Aull K, Rouzine IM, Weinberger LS. A hardwired HIV latency program. *Cell* 2015 ; 160 : 990-1001.

104. Lassen KG, Ramyar KX, Bailey JR, Zhou Y, Siliciano RF. Nuclear retention of multiply spliced HIV-1 RNA in resting CD4+ T cells. *PLoS Pathog* 2006 ; 2 : 0650-61.
105. Mousseau G, Clementz MA, Bakeman WN, *et al.* An analog of the natural steroidal alkaloid cortistatin a potently suppresses Tat-dependent HIV transcription. *Cell Host Microbe* 2012 ; 12 : 97-108.
106. Mediouni S, Chinthapudi K, Ekka MK, *et al.* Didehydro-cortistatin a inhibits HIV-1 by specifically binding to the unstructured basic region of Tat. *mBio* 2019 ; 10 : 1-19.
107. Li C, Mousseau G, Valente ST. Tat inhibition by didehydro-cortistatin A promotes heterochromatin formation at the HIV-1 long terminal repeat. *Epigenetics Chromatin* 2019 ; 12 : 1-17.
108. Kessing CF, Nixon CC, Li C, *et al.* *In vivo* suppression of HIV rebound by didehydro-Cortistatin A, a "block-and-lock" strategy for HIV-1 cure. *Cell Rep* 2017 ; 176 : 139-48.
109. Mousseau G, Aneja R, Clementz MA, Mediouni S, Lima NS, Haregot A. Resistance to the Tat inhibitor didehydro-cortistatin A is mediated by heightened basal HIV-1 transcription. *mBio* 2019 ; 10 : 1-19.
110. Mediouni S, Kessing CF, Jablonski JA, *et al.* The Tat inhibitor didehydro-cortistatin A suppresses SIV replication and reactivation. *FASEB J* 2019 ; 33 : 8280-93.
111. Paul R, Dutta D, Paul R, Dash J. Target-directed azide-alkyne cycloaddition for assembling HIV-1 TAR RNA binding ligands. *Angew Chem Int Ed Engl* 2020 ; 59 : 12407-11.
112. Leoz M, Kukanja P, Luo Z, *et al.* HEXIM1-Tat chimera inhibits HIV-1 replication. *PLoS Pathog* 2018 ; 14 : 1-18.
113. Jadowsky JK, Nojima M, Okamoto T, Fujinaga K. Dominant negative mutant cyclin T1 proteins that inhibit HIV transcription by forming a kinase inactive complex with Tat. *J Gen Virol* 2008 ; 89 : 2783-7.
114. Meredith LW, Sivakumaran H, Major L, Suhrbier A, Harrich D. Potent inhibition of HIV-1 replication by a Tat mutant. *PLoS One* 2009 ; 4 : 1-11.
115. Jin H, Li D, Sivakumaran H, *et al.* Shutdown of HIV-1 transcription in T cells by Nullbasic, a mutant tat protein. *mBio* 2016 ; 7 : 1-11.
116. Jin H, Sun Y, Li D, *et al.* Strong *in vivo* inhibition of HIV-1 replication by nullbasic, a Tat mutant. *mBio* 2018 ; 67 : 511-7.
117. Ott M, Emiliani S, van Lint C, *et al.* Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Genes Dev* 1995 ; 75 : 1822.
118. Ajasin D, Eugenin EA. HIV-1 Tat: role in bystander toxicity. *Front Cell Infect Microbiol* 2020 ; 10 : 61.
119. Campbell GR, Pasquier E, Watkins J, *et al.* The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 48197-204.
120. Sabatier J-M, Vives E, Mabrouk K, *et al.* Evidence for neurotoxic activity of Tat from human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1991 ; 65 : 961-7.
121. Banks WA, Robinson SM, Nath A. Permeability of the blood-brain barrier to HIV-1 Tat. *Exp Neurol* 2005 ; 193 : 218-27.
122. Philippon V, Vellutini C, Gambarelli D, *et al.* The basic domain of the lentiviral Tat protein is responsible for damages in mouse brain involvement of cytokines. *Virology* 1994 ; 205 : 519-29.
123. Nath A, Conant K, Chen P, Scott C, Major EO. Transient exposure to HIV-1 Tat protein results in cytokine production in macrophages and astrocytes: a hit and run phenomenon. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 17098-102.
124. Liu X, Jana M, Dasgupta S, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) tat induces nitric-oxide synthase in human astroglia. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 39312-9.
125. Wan Z, Chen X. Triptolide inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting proteasomal degradation of Tat protein. *Retrovirology* 2014 : 1-13.
126. Fu Q, Huang X, Shu B, *et al.* Inhibition of mitochondrial respiratory chain is involved in triptolide-induced liver injury. *Fitoterapia* 2011 ; 82 : 1241-8.
127. Yang F, Zhuo L, Ananda S, Sun T, Li S, Liu L. Role of reactive oxygen species in triptolide-induced apoptosis of renal tubular cells and renal injury in rats. *Med Sci* 2011 ; 31 : 335-41.
128. Liu J, Jiang Z, Liu L, *et al.* Triptolide induces adverse effect on reproductive parameters of female Sprague-Dawley rats. *Drug Chem Toxicol* 2010 ; 34 : 1-7.
129. Lacombe B, Morel M, Margottin-Goguet F, Ramirez BC. Specific inhibition of HIV infection by the action of spironolactone in T cells. *J Virol* 2016 ; 90 : 10972-80.
130. Alekseev S, Ayadi M, Brino L, Egly JM, Larsen AK, Coin F. A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIID and the chemosensitization of tumor cells to platinum. *Chem Biol* 2014 ; 21 : 398-407.
131. Mori L, Jenike K, Yeh Y-HJ, *et al.* The XPB subunit of the TFIID complex plays a critical role in HIV-1 transcription, and XPB inhibition by spironolactone prevents HIV-1 reactivation from latency. *J Virol* 2021 ; 95 : e01247-1320.
132. Schonhofer C, Yi J, Sciorillo A, *et al.* Flavonoid-based inhibition of cyclin-dependent kinase 9 without concomitant inhibition of histone deacetylases durably reinforces HIV latency. *Biochem Pharmacol* 2021 ; 186 : 114462.
133. Jean MJ, Hayashi T, Huang H, *et al.* Curaxin CBL0100 blocks HIV-1 replication and reactivation through inhibition of viral transcriptional elongation. *Front Microbiol* 2017 ; 8 : 2007.
134. Zhou C, Huang Y, Li Y, *et al.* A new small-molecule compound, Q308, silences latent HIV-1 provirus by suppressing Tat- and FACT-mediated transcription. *Antimicrob Agents Chemother* 2021 ; 65 : e0047021.
135. Johnson TA, Sohn J, Vaske YM, *et al.* Myxobacteria versus sponge-derived alkaloids: The bengamide family identified as potent immune modulating agents by scrutiny of LC-MS/ELSD libraries. *Bioorg Med Chem* 2012 ; 20 : 4348-55.
136. Tietjen I, Williams DE, Read S, *et al.* Inhibition of NF- κ B-dependent HIV-1 replication by the marine natural product bengamide A. *Antiviral Res* 2018 ; 152 : 94-103.
137. Bakkour N, Lin Y, Maire S, Ayadi L, Mahuteau-betzer F. Small-molecule inhibition of HIV pre-mRNA splicing as a novel antiretroviral therapy to overcome Drug resistance. *PLoS Pathog* 2007 ; 3(10) : 1530-9.
138. Shkreta L, Blanchette M, Toutant J, *et al.* Modulation of the splicing regulatory function of SRSF10 by a novel compound that impairs HIV-1 replication. *Nucleic Acids Res* 2017 ; 45 : 4051-67.
139. Campos N, Myburgh R, Garcel A, *et al.* Long lasting control of viral rebound with a new drug ABX464 targeting Rev - mediated viral RNA biogenesis. *Retrovirology* 2015 ; 12 : 1-15.
140. Vautrin A, Manchon L, Garcel A, *et al.* Both anti-inflammatory and antiviral properties of novel drug candidate ABX464 are mediated by modulation of RNA splicing. *Sci Rep* 2019 ; 9 : 1-15.
141. Moron-Lopez S, Bernal S, Wong JK, Martinez-Picado J, Yukl SA. ABX464 decreases the total HIV reservoir and HIV transcription initiation in CD4+ T cells from HIV- infected ART-suppressed individuals. *Clin Infect Dis* 2021 : ciab733.

- 142.** Suzuki K, Juelich T, Lim H, *et al.* Closed chromatin architecture is induced by an RNA duplex targeting the HIV-1 promoter region. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 23353-63.
- 143.** Ahlenstiel C, Mendez C, Lim STH, *et al.* Novel RNA duplex locks HIV-1 in a latent state via chromatin-mediated transcriptional silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* 2015 ; 4 : e261.
- 144.** Méndez C, Ledger S, Petoumenos K, Ahlenstiel C, Kelleher AD. RNA-induced epigenetic silencing inhibits HIV-1 reactivation from latency. *Retrovirology* 2018 ; 15(1) : 67.
- 145.** Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A, Anderson D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat Mater* 2013 ; 12 : 967-77.
- 146.** Nikam RR, Gore KR. Journey of siRNA: clinical developments and targeted delivery. *Nucleic Acid Ther* 2018 ; 28 : 209-24.
- 147.** Protopopescu C, Raffi F, Roux P, *et al.* Factors associated with non-adherence to long-term highly active antiretroviral therapy: a 10 year follow-up analysis with correction for the bias induced by missing data. *J Antimicrob Chemother* 2009 ; 64 : 599-606.
- 148.** Geis FK, Goff SP. Silencing and transcriptional regulation of endogenous retroviruses: an overview. *Viruses* 2020 ; 12 : 884.
- 149.** Kulkosky J, Bray S. HAART-persistent HIV-1 latent reservoirs: their origin, mechanisms of stability and potential strategies for eradication. *Curr HIV Res* 2006 ; 4 : 199-208.
- 150.** Deleage C, Wietgreffe SW, del Prete G, *et al.* Defining HIV and SIV reservoirs in lymphoid tissues. *Pathog Immun* 2016 ; 1 : 68-106.
- 151.** Alidjinou EK, Bocket L, Hober D. Quantification of viral DNA during HIV-1 infection: a review of relevant clinical uses and laboratory methods. *Pathol Biol (Paris)* 2015 ; 63 : 53-9.