

Inhibiteurs de Nef du VIH-1 : applications et développements pour une guérison efficace

Inhibitors of HIV-1 Nef: applications and developments for a practical cure

Antony Lurie¹
 Corby Fink^{1,2}
 Geneviève Gosselin¹
 Gregory A. Dekaban^{1,2}
 Jimmy D. Dikeakos¹

¹ Department of Microbiology and Immunology, Schulich School of Medicine and Dentistry, University of Western Ontario, Dental Sciences Building, Room 3007J, 1151 Richmond St, N6A5C1 London, Ontario, Canada

² Biotherapeutics Research Laboratory, Robarts Research Institute, London, Ontario, Canada

Article accepté le 10 février 2022

Résumé. La thérapie anti-rétrovirale peut contrôler la réplication du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) chez les individus vivant avec le VIH. Par contre, ces traitements ne constituent pas une guérison et aucune approche pour une guérison du VIH-1 n'a encore montré de succès lors des études cliniques. Les approches de guérison sont souvent contrées *in vivo* par des barrières développées par le VIH-1. L'inhibition pharmacologique de la protéine accessoire Nef du VIH-1 représente une approche ambitieuse et prometteuse pour développer une nouvelle stratégie de guérison. Des petites molécules inhibitrices de Nef peuvent inverser les défauts reliés à l'infection par le VIH dans la signalisation des récepteurs des cellules T et les kinases, l'apoptose, l'autophagie et surtout, la présentation d'antigène. Ensemble, ces activités démontrent la grande capacité des inhibiteurs de Nef à être appliqués comme agents thérapeutiques dans un traitement contre le VIH-1. Dans cette revue, nous présentons les motifs pour lesquels Nef constitue une cible thérapeutique et nous soulignons les progrès effectués dans l'identification et le développement d'inhibiteurs de Nef.

Mots clés : virus de l'immunodéficience humaine (VIH), Nef, protéine accessoire, inhibiteurs, guérison

Abstract. Antiretroviral therapy can control human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication in people living with HIV; however, these treatments are not curative and no practical approach for an HIV-1 cure has yet shown success in clinical trials. Counteracting the multiple barriers HIV-1 presents against a practical cure is a direct means to functionalize these curative approaches *in vivo*. Pharmacological inhibition of the HIV-1 accessory protein, Nef, represents a particularly promising and ambitious approach, with Nef inhibitors holding the potential to reverse HIV-1-related defects in T cell receptor and kinase signaling, apoptosis, autophagy and most importantly, antigen presentation. Together, the capacity for Nef inhibitors to restore these activities underscores their potential as supportive agents in a practical HIV-1 cure. In this review, we outline a rationale for pharmacologically targeting Nef and review the progress made in the identification and development of Nef inhibitors.

Key words: human immunodeficiency virus (HIV), Nef, accessory protein, inhibitor, cure

Les traitements antirétroviraux (TAR) combinés peuvent contrôler la réplication du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) chez les individus vivant avec le VIH (*people living with HIV*, PLWH) en empêchant le développement du syndrome

d'immunodéficience acquise (sida) [1]. Cependant, les TAR n'offrent pas de guérison et les réservoirs des cellules infectées par le VIH-1 sont résistants aux TAR chez les individus traités. Pour cette raison, les PLWH doivent recevoir un traitement TAR continu et à vie, créant des difficultés au niveau de l'adhésion, de l'accessibilité au traitement ainsi qu'un risque d'un traitement interrompu et inefficace [2-4]. De plus, les PLWH traités aux TAR éprouvent des problèmes de santé chroniques comme le vieillissement prématuré ainsi

Correspondance : J.D. Dikeakos
 <Jimmy.Dikeakos@uwo.ca>

que la stigmatisation rattachée à la maladie [5-8]. Considérant que les taux cibles de 90-90-90 pour le dépistage mondial du statut du VIH et l'amélioration de la qualité de vie des PLWH n'ont pas été atteints à la fin de 2020, la guérison du VIH-1 demeure une priorité pour l'amélioration de la condition de vie des PLWH [9].

Plusieurs stratégies ont été développées pour la guérison du VIH-1 comme la réactivation et l'élimination [10, 11], le blocage et verrouillage [12], la vaccination thérapeutique [13], l'immunothérapie à lymphocytes T exprimant un récepteur chimérique à l'antigène (*Chimeric Antigen Receptor*, CAR) [14]. Les traitements aux cytokines, aux inhibiteurs des points de contrôle immunitaires et/ou le traitement avec des anticorps neutralisants [15, 16] sont aussi d'autres exemples de stratégies développées pour la guérison du VIH-1. Administrée seule ou en combinaison avec d'autres méthodes, aucune de ces stratégies ne s'est avérée un succès dans les essais cliniques. Ces échecs cliniques sont étroitement liés aux barrières créées par le VIH-1 [17]. Plusieurs de ces approches, dont la réactivation et l'élimination, la vaccination thérapeutique, l'immunothérapie CAR à lymphocytes T ou l'utilisation d'anticorps, ont un effet direct sur l'immunité. Or, le VIH-1 peut contourner la réponse immunitaire et conduire à l'inefficacité de ces approches *in vivo* [18-20]. Les conséquences de l'infection virale sur des processus cellulaires comme la signalisation des récepteurs des cellules T, l'apoptose et l'autophagie, peuvent aussi altérer le succès de la guérison en empêchant l'inversion de la latence ou en inhibant l'activité des lymphocytes T cytotoxiques (*cytotoxic T lymphocyte*, CTL) [17].

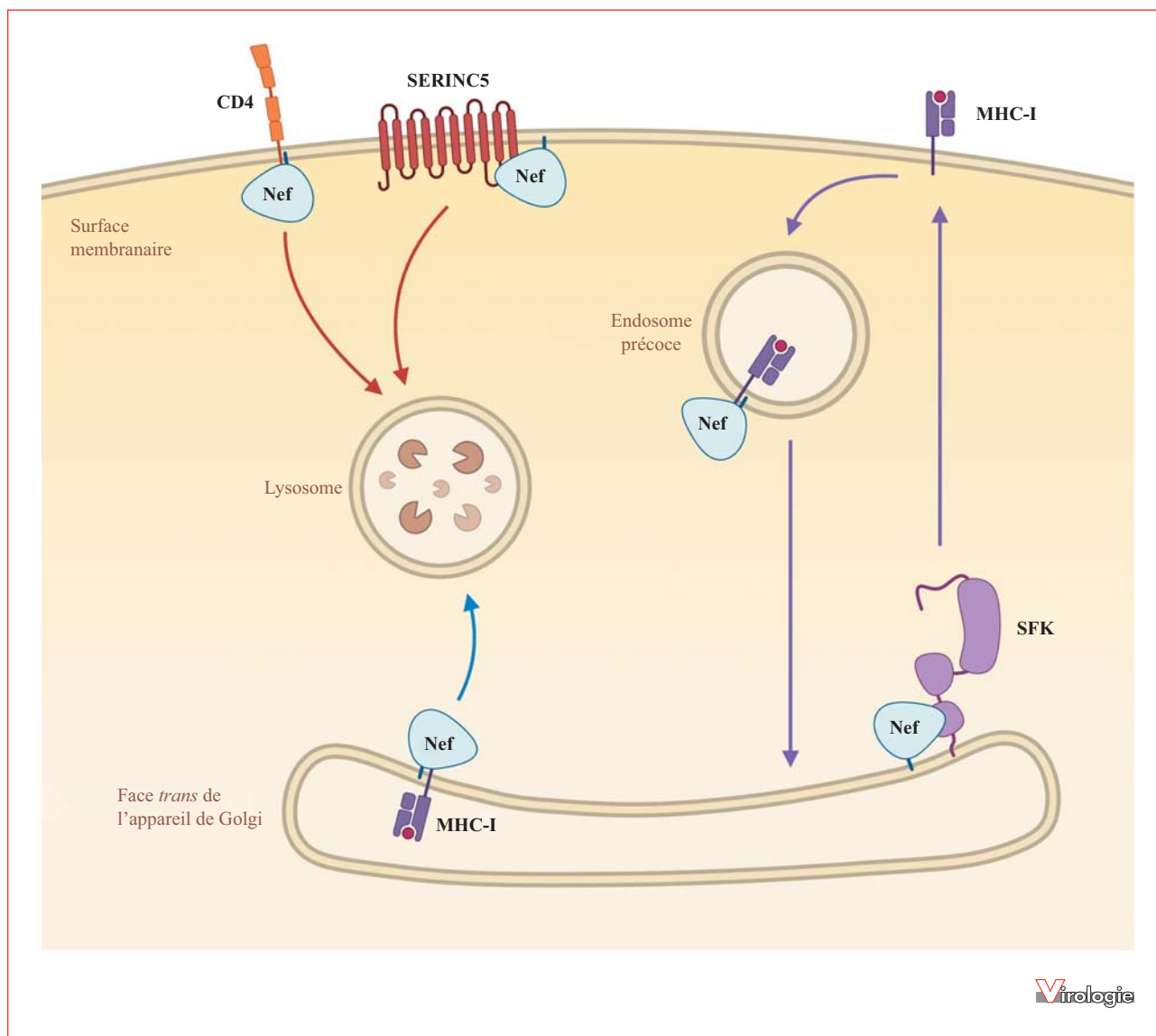
La protéine accessoire Nef du VIH-1 est impliquée dans plusieurs de ces processus suggérant que Nef est une protéine centrale dans les efforts de guérison ainsi qu'une cible attrayante pour une inhibition pharmacologique [21-28]. Dans cette revue, nous résumerons les éléments de base de la biologie de Nef ainsi que les implications de cette biologie sur les méthodes de guérison. Nous aborderons également les applications potentielles des inhibiteurs de Nef dans la guérison du VIH-1 et nous résumerons les progrès et les obstacles à surmonter dans la réalisation d'une utilisation clinique ciblée, non-toxique et efficace des inhibiteurs de Nef.

Nef

Nef est l'une des quatre protéines accessoires (Nef, Vif, Vpr et Vpu) du VIH-1. Nef n'est pas strictement requise pour la réplication virale *in vitro*, mais est nécessaire à la réplication *in vivo* du VIH-1 en augmentant la production et l'infectivité des virions en plus d'inhiber l'immunité

antivirale [22, 23, 29, 30]. Plusieurs modèles animaux et des études de cohortes ont démontré l'importance de Nef dans la réplication virale et durant la pathogénèse du VIH-1. Notamment, l'infection des macaques rhésus avec une souche du virus d'immunodéficience simienne (VIS) déficiente en Nef a démontré une réduction de la réplication virale ainsi qu'une pathogénèse diminuée [31]. Dans plusieurs modèles de souris transgéniques, l'expression de Nef est suffisante pour réduire le nombre de cellules T CD4⁺ (*cluster of differentiation 4-positive*) [32-35]. Dans un autre modèle de souris transgéniques, Nef provoque le développement d'un phénotype sévère qui ressemble au sida caractérisé par l'émaciation, l'atrophie thymique ainsi qu'une perte de cellules T CD4⁺ [35]. Des études chez les souris humanisées ont également démontré le rôle primordial de Nef dans la réplication *in vivo* du VIH-1 et durant la pathogénèse [36-38]. De plus, des études de cohortes ont décrit que des individus infectés avec une souche de VIH-1 déficiente en Nef ont une diminution de la réplication virale et un ralentissement ou un arrêt de la progression de la maladie [39-42].

Au niveau moléculaire, Nef peut former plusieurs interactions protéine-protéine avec des facteurs de l'hôte. Ces interactions peuvent mener à des altérations des voies de signalisation intracellulaires et du trafic membranaire. Par ces mécanismes, Nef agit sur la modulation des récepteurs à la surface de la membrane de la cellule tels que le CD4 [43, 44], le SERINC5 (*serine incorporator 5*) [45-47] et le complexe majeur de l'histocompatibilité de classe I (*major histocompatibility complex class I*, MHC-I) (*figure 1*) [48-50]. Par exemple, Nef facilite le contrôle du CD4 à la surface cellulaire en conjuguant la molécule AP-2 (*adaptor protein 2*) à la queue cytoplasmique du CD4 [51, 52]. Cette liaison permet l'endocytose du CD4 et sa dégradation dans le lysosome. La diminution du CD4 à la surface cellulaire limite la surinfection virale [53] ainsi que la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) [54]. Nef utilise également un mécanisme dépendant de la protéine AP-2 pour contrôler le facteur de restriction SERINC5 pour ainsi promouvoir l'infection [45-47, 55]. Nef contrôle le niveau du MHC-I à la surface cellulaire par deux modes, appelés le mode de signalisation et le mode stœchiométrique. Dans le mode de signalisation, Nef active les kinases de la famille Src (*Src family kinase*, SFK) nommées Hck (*hematopoietic cell kinase*), Lyn (*Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase*) et c-Src (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*), pour ainsi former un complexe de protéines qui inclut une SFK, la ZAP-70 (*zeta-chain-associated protein kinase 70*) ou Syk (*spleen tyrosine kinase*) et la PI3K (*phosphoinositidine-3-kinase*) [56-59]. L'activité de la PI3K augmente l'endocytose du MHC-I au niveau de la surface cellulaire. Par la suite, Nef retarde le



Virologie

Figure 1. Aperçu des principales activités de Nef du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Dans les cellules infectées, Nef se lie au CD4 (*cluster of differentiation 4*) et au SERINC5 (*serine incorporator 5*) pour faciliter leur endocytose et leur trafic au lysosome pour la dégradation (flèches rouges). Nef est également localisé à la face *trans* de l'appareil de Golgi où il se lie avec les kinases de la famille Src (*Src family kinase*, SFK) pour initier le mode de signalisation et ainsi réduire la quantité de complexe majeur de l'histocompatibilité (*major histocompatibility complex class I*, MHC-I) à la surface cellulaire. Ce mode d'action commence avec l'endocytose de classe I du MHC-I, suivie par le trafic de MHC-I aux endosomes puis à la face *trans* de l'appareil de Golgi (flèches mauves). De plus, dans le mode stœchiométrique, Nef s'empare du MHC-I nouvellement synthétisé pour l'envoyer vers les lysosomes où il sera dégradé (flèche bleue). Créé avec Biorender.com.

recyclage du MHC-I à la surface de la cellule en acheminant le MHC-I des endosomes précoces vers la face *trans* de l'appareil de Golgi où le MHC-I demeure séquestré [49]. Dans le mode stœchiométrique, Nef agit sur le MHC-I nouvellement produit au début de la voie sécrétoire pour éventuellement contribuer à la dégradation du MHC-I à l'intérieur du lysosome [60, 61]. Plusieurs protéines du trafic membranaire sont impliquées durant ces

processus incluant les PACS-1/2 (*phosphofurin acidic cluster sorting proteins 1 and 2*), AP-1 (*adaptor protein 1*), ARF1/6 (*ADP-ribosylation factor 1 and 6*), la clathrine et β -COP (*coatamer subunit β*). Ces deux modes contribuent à réduire l'abondance du MHC-I à la surface de la cellule, ce qui permet d'abolir la présentation de l'antigène viral par les cellules infectées empêchant ainsi l'activité des CTL [21].

Plusieurs autres récepteurs sont également modulés par Nef incluant les récepteurs de co-stimulation CD28, CD80 et CD86 [62-64], les co-récepteurs du VIH-1, CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*) et CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) [65, 66] et le récepteur inhibiteur des points de contrôles immunitaires, Tim-3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*) [67]. Nef est aussi impliqué dans la liaison et la modulation de plusieurs autres facteurs de signalisation et de trafic comme la famille des kinases Tec (*Tec family kinase*, TFK) [68, 69], PAK2 (*p21-activated kinase 2*) [70], Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) [71], PI3K [24, 56, 58], ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) [25] et la protéine kinase C (PKC) [72]. Les nombreuses interactions entre Nef et les protéines hôtes sont essentielles pour les effets de Nef sur les cellules infectées et les cellules avoisinantes. Ces effets incluent l'altération de la signalisation provenant des récepteurs des cellules T [27, 28], l'activation cellulaire [27, 28, 30, 73], la chimiotaxie des lymphocytes [73], le relâchement de vésicules extracellulaires [74], l'autophagie [26] et l'apoptose [24, 25, 75]. Ensemble, les effets de Nef assurent une réplication virale optimale en plus de contribuer à la pathogénèse.

Applications des inhibiteurs de Nef dans la guérison du VIH-1

Le VIH-1 possède plusieurs mécanismes qui forment des barrières contre une guérison. Étonnamment, le développement de stratégies de guérison s'est principalement orienté vers une optimisation des agents de guérison au détriment de l'inhibition des barrières dues à des protéines du VIH-1. Pourtant, le développement de mécanismes qui seraient connexes à l'agent de guérison lui-même et qui pourraient augmenter l'efficacité d'une guérison représente une avenue intéressante. Considérant le rôle primordial et multifactoriel de Nef durant l'infection par le VIH-1, des inhibiteurs pharmacologiques de Nef pourraient s'avérer être une stratégie puissante pour stimuler l'efficacité de plusieurs stratégies de guérison, incluant la réactivation et l'élimination et les immunothérapies.

Les implications de Nef dans l'inversion de la latence

La latence est un mécanisme central du VIH-1 qui maintient le virus dans des réservoirs chez les PLWH traités par des TAR [76, 77]. Lors de la latence, les cellules infectées ne produisent pas facilement de virions, d'où l'absence remarquée des mécanismes de la réponse immunitaire de l'hôte ou d'effets cytopathiques viraux. Ainsi, une diminution du réservoir latent pourrait être atteinte en réactivant

les provirus latents à l'aide d'un agent d'inversion de la latence (réactivation) qui serait suivi par une élimination par des mécanismes immunitaires et des effets cytopathiques viraux [10, 11]. Ainsi, la diminution du réservoir latent pourrait permettre la rémission et le contrôle, à long terme, de la charge virale indépendamment du TAR.

Malgré le succès théorique de la réactivation et l'élimination, cette approche n'a pas démontré un succès considérable dans la diminution de la taille du réservoir latent ou dans le délai du rebond viral après l'arrêt du TAR. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette réalité mais une réactivation virale inefficace et une inégalité au niveau de l'inversion dans différents types de cellules immunitaires sont au centre du problème [19]. Notamment, Nef pourrait jouer un rôle clé dans l'inversion de la latence par ses effets sur la signalisation dans les cellules hôtes. En effet, plusieurs études démontrent le rôle de Nef dans l'augmentation de la réplication virale principalement due aux effets de celui-ci sur les récepteurs des cellules T et sur ses effets au niveau de la signalisation générale des kinases [27, 28, 78, 79] suggérant ainsi que Nef pourrait promouvoir l'inversion de la latence [80-82]. D'autre part, les événements de la signalisation cellulaire associés à Nef lors du renforcement de la réplication virale sont aberrants. Ceci est particulièrement vrai pour la signalisation des récepteurs des cellules T où Nef dérègle la signalisation limitant ainsi la réponse antivirale et l'activation de la mort cellulaire (*activation-induced cell death*, AICD) [28]. Pendant ce temps, une voie compensatoire de signalisation associée à Nef est établie pour promouvoir la réplication virale. À la lumière de cette dualité, Nef pourrait peut-être porter entrave à l'inversion de la latence suggérant que des inhibiteurs bloquant les effets de Nef sur la signalisation pourraient agir comme agents d'inversion. Les effets de Nef sur l'inversion de la latence sont encore méconnus et pourraient aussi varier selon l'agent utilisé.

Implications de Nef dans l'élimination des cellules infectées

L'élimination efficace des cellules infectées est un point central de plusieurs approches de guérison. Pourtant, aucune d'entre elles n'a eu de succès *in vivo*. Malgré les quelques réussites de réactivation et élimination dans la réactivation virale, aucune n'a été accompagnée d'une réduction de la taille du réservoir [19, 20]. Plusieurs lacunes similaires ont été identifiées lors d'essais de vaccins thérapeutiques [13]. L'inefficacité de ces approches découle principalement de l'incapacité de la réponse immunitaire adaptative à se débarrasser des cellules infectées par le VIH-1 *in vivo*. Plusieurs évidences suggèrent qu'une réponse anti-VIH-1 robuste des CTL est nécessaire pour l'élimination lors du processus de réactivation

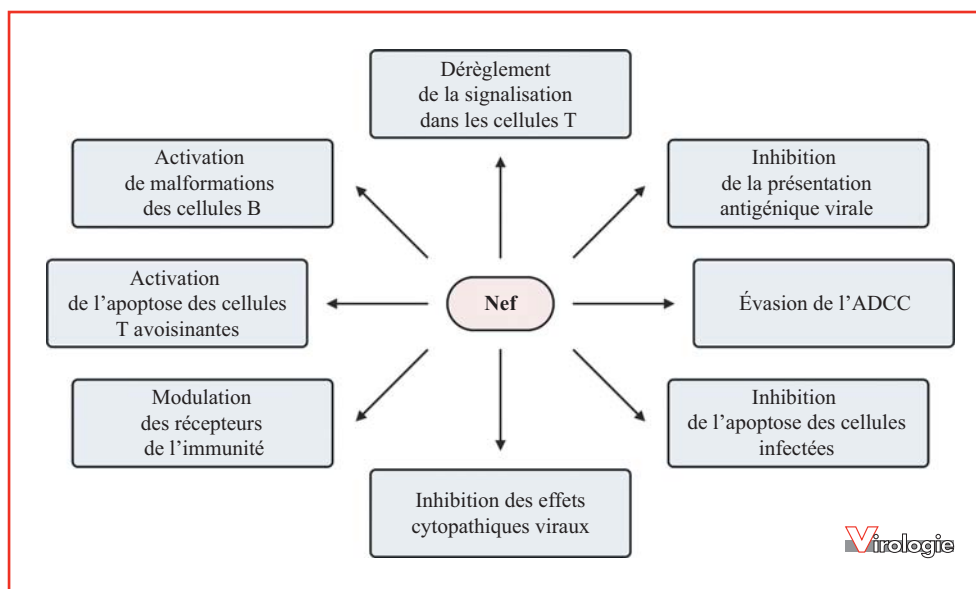


Figure 2. Sommaire de quelques activités de Nef qui pourraient être inhibées pour obtenir une guérison efficace du virus de l'immuno-déficience humaine de type 1 (VIH-1). Créé avec Biorender.com.

et élimination ou lors d'immunothérapies [18, 83]. Toutefois, les cellules infectées contenant du provirus demeurent résistantes aux CTL même en l'absence de mutations qui permettent d'échapper à l'immunité, d'une faible inversion de la latence, d'une compartimentation ou d'un dysfonctionnement des CTL, soulignant ainsi l'importance de stimuler les CTL anti-VIH-1 pour obtenir une guérison [84]. Nef diminue spécifiquement les MHC-I de classes A et B de la surface cellulaire, inhibant ainsi la présentation de l'antigène des cellules infectées par le VIH-1 à des CTL anti-VIH-1 et provoquant ainsi la persistance des cellules infectées *in vivo* [21, 48]. L'inhibition de la capacité de Nef à réduire le MHC-I de la surface cellulaire pourrait être une approche de guérison qui repose sur l'activité des CTL qui élimineraient les cellules infectées.

Les cellules infectées par le VIH-1 peuvent résister à l'élimination par d'autres effets de Nef incluant l'inhibition de la mort cellulaire associée au Fas- et au TNF- α - (*tumor necrosis factor alpha*) par l'inhibition de ASK1 [25], l'évasion de l'ADCC par le contrôle du CD4 [54] ou par l'inhibition des effets cytopathiques viraux par la régulation de la PLK1 (*polo-like kinase 1*) [85]. De plus, Nef dérègle l'immunité adaptative de plusieurs façons telles que le dérèglement de la signalisation des récepteurs des cellules T [27, 28], la diminution des récepteurs de co-stimulation CD28, CD80 et CD86 [62-64], l'augmentation de Tim-3 [67], la stimulation de l'apoptose des cellules T avoisinantes [86] ou l'inhibition de la maturation des cellules B [87]. Ensemble, ces effets de Nef reflètent son rôle

dans la prévention de l'élimination des cellules infectées par le VIH-1 et soulignent le rôle potentiel des inhibiteurs de Nef dans les approches de guérison, comme la réactivation et élimination, les immunothérapies, la vaccination thérapeutique et les thérapies cellulaires (résumé dans la *figure 2*).

Progrès dans le développement des inhibiteurs de Nef

Durant les 20 dernières années, plusieurs groupes ont démontré le potentiel des inhibiteurs de Nef, incluant des petites molécules et des inhibiteurs sous forme de peptides et de protéines (résumé dans le *tableau 1*). L'utilisation des inhibiteurs de Nef dans la guérison du VIH-1 a également été explorée. De plus, les inhibiteurs de Nef ont une utilisation potentielle comme médicament antirétroviral ou possiblement dans le traitement des conditions chroniques associées à l'infection par le VIH-1.

Des petites molécules qui inhibent la capacité de Nef à activer les kinases

L'inhibition de l'interaction entre Nef et les kinases, plus précisément, les SFK dont la Hck, Lyn et c-Src, est un point central dans le développement des inhibiteurs de Nef. Ces molécules devraient inhiber la capacité de Nef à diminuer la quantité du MHC-I à la surface de la cellule. Ainsi ces petites molécules ont des effets négatifs sur la réplication

Tableau 1 Sommaire des inhibiteurs de Nef.

Inhibiteur	Mécanismes d'action proposés	Effet sur MHC-I	Effet sur CTL	Effet sur la réplication	Effet sur l'infektivité	Autres effets clés	Références
Petites molécules							
Adriamycine	Inhibition du complexe Nef:Hck en réduisant l'expression Hck	ND	ND	ND	ND		[93]
D1, DLC27 et DLC27-14	Inhibition orthostérique des interactions de Nef avec les domaines SH3	+	ND	+ ^a	- ^a	Peut déstabiliser la structure de Nef et causer sa protéolyse par la protéase du VIH-1	[94-96]
4-amino-diphenylfuranopyrimidines (DFP-4AP, DFP-4AB, DFP-APF)	Inhibition de l'activité kinase Hck et Lyn induite par la liaison de Nef au site actif	ND	ND	+	ND		[97-100]
B9 et analogues	Inhibition de la dimérisation de Nef en se liant à la surface de dimérisation	+	+	+	+	Niveaux de CD4 rétablis et effet sur l'activation des SFK et de TFK	[69, 101-105, 107]
DQBS	Inhibition de l'activation des SFK	+	+	+	-		[96, 107]
E11	Inhibition de la dimérisation de Nef par des mécanismes inconnus	ND	ND	ND	ND		[106]
2c	Inhibition allostérique ou orthostérique du complexe Nef:SFK	+	ND	+ ^a	+ ^a		[59, 90]
Lovastatine	Inhibition de l'interaction Nef:AP-1	+	+	ND	+	Rétablissement des niveaux CD4 et SERINC5 à la surface	[109, 111]
Concanamycine A	Inhibition du complexe Nef:MHC-I:AP-1	+	+	ND	ND		[111]
Analogues de la guanidine alcaloïde (composés 14, 17 et 22)	Inhibition des interactions de Nef avec p53, Lck et l'actine	ND	ND	ND	ND		[113]

Tableau 1 (Suite).

Inhibiteur	Mécanismes d'action proposés	Effet sur MHC-I	Effet sur CTL	Effet sur la réplication	Effet sur l'infectivité	Autres effets clés	Références
NSC13987 et ses analogues (AMS-55)	Inhibition de l'interaction Nef:calnexine	ND	ND	+	ND	Rétablit le transport du cholestérol et effet sur ABCA1	[117, 118]
Triciribine	Inconnu	ND	ND	+	-		[121]
Inhibiteurs peptidiques ou protéines							
sdAb19	Liaison à la poche C-terminale de Nef	-	ND	+	+	Rétablit les niveaux de CD4; inhibe le complexe Nef:PAK2 et les effets sur le remodelage de l'actine. Inhibe les effets de maturation des cellules T ainsi que les effets dans un modèle murin	[129, 133]
Protéines qui interagissent avec Nef	Liaison avec l'hélice polyproline de la poche de Nef qui lie la boucle RT et le domaine de liaison CD4	+	ND	ND	+	Rétablissement de CCR5 et de CD4	[130]
Neffins	Liaison avec l'hélice polyproline de la poche qui lie la boucle RT et la poche C-terminale	+	ND	ND	+	Rétablit CD4, inhibe l'activation de Hck, bloque la relocalisation de Lck ainsi que les effets dans les macrophages	[131-133]

ND : non déterminé.

^a Seulement abordé dans des études subséquentes effectuées par différents groupes.

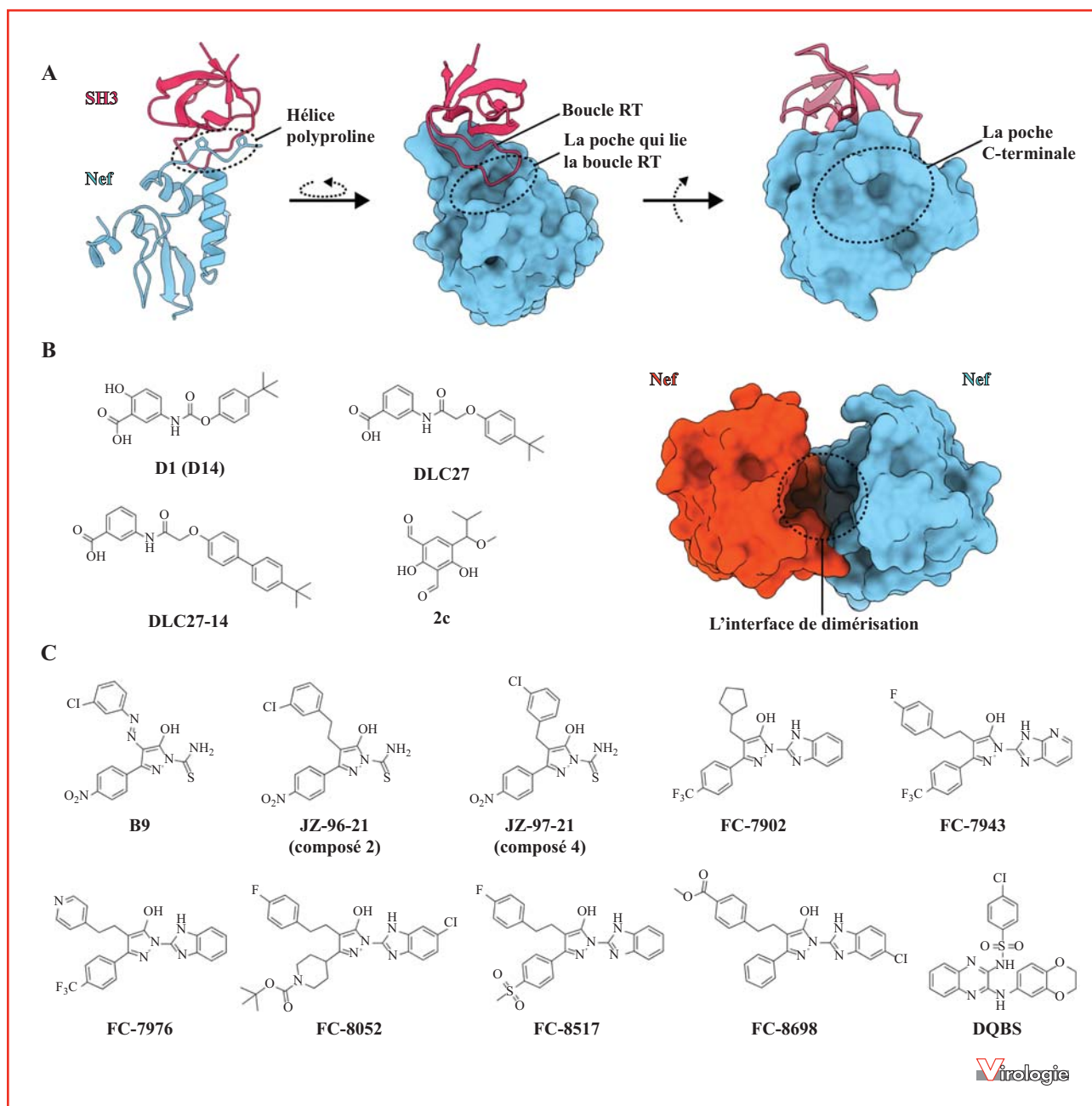


Figure 3. Petites molécules inhibant l'activation des kinases par Nef. (A) Aperçu de l'interaction entre Nef (bleu) et le domaine SH3 (*Src homology 3*) des kinases de la famille Src (*Src family kinase*, SFK). Le domaine SH3 se lie à l'hélice polyproline de Nef (gauche). La liaison de la boucle RT de SH3 à la poche de Nef qui lie la boucle RT (centre). La poche allosterique au domaine C-terminal de Nef est représentée (droite). La représentation a été effectuée avec le programme UCSF ChimeraX [136] en utilisant la structure NL4-3 Nef T71R en complexe avec Fyn SH3 R96I (PDB : 1EFN) [91]. (B) Structures d'une sélection d'inhibiteurs de Nef qui devraient se lier à l'hélice polyproline (2c), la poche de liaison de la boucle RT (D1, DLC27, DLC27-14, 2c) et/ou la poche C-terminale de Nef (2c). (C) Structures d'une sélection d'inhibiteurs de Nef qui devraient bloquer la dimérisation de Nef et qui pourrait se lier à la surface de dimérisation de Nef. (D) Aperçu d'un dimère de Nef dérivé de la structure cristallographique du complexe Nef:Fyn-SH3 avec une surface de liaison formée à l'interface de dimérisation de Nef. Cette visualisation a été créée avec UCSF ChimeraX [136] en utilisant la structure cristallographique NL4-3 Nef T71R en complexe avec Fyn SH3 R96I (PDB : 1EFN) [91].

virale, l'infectivité du VIH-1 ainsi que sur la pathogénèse [58, 59, 88-90]. Pour lier et activer les SFK, Nef interagit avec le domaine SH3 (*Src homology 3*) de SFK en utilisant une hélice alpha contenant des résidus prolines et une poche hydrophobe [91]. Ainsi, l'hélice alpha de Nef riche en prolines et la poche hydrophobe se lient à la boucle RT dans le domaine SH3 des SFK, communément appelée la poche de Nef liant la boucle RT (*figure 3A*). La formation de ce complexe libère le domaine SH3 qui est lui-même lié au domaine de régulation SH2-kinase des SFK [92]. Le domaine SH3 libéré peut ainsi activer la SFK de manière continue. De plus, Nef utilise les mêmes surfaces pour lier le domaine SH3 des TFK [68]. Donc, des inhibiteurs ciblant l'interaction Nef:SFK devraient réduire l'activation des SFK et aussi réduire les effets de Nef sur la signalisation. Le premier criblage répertorié pour des petites molécules inhibant Nef a été effectué par la technique double-hybride en cellules de mammifères pour ainsi identifier un inhibiteur de l'interaction Nef:Hck [93]. Le criblage de 500 composés synthétiques et naturels a dévoilé que l'adriamycine et quatre de ses dérivés seraient des inhibiteurs potentiels de l'interaction Nef:Hck. Malheureusement, l'effet de l'adriamycine sur l'interaction Nef:Hck ne faisait que réduire les niveaux intracellulaires de Hck et son utilisation a été abandonnée.

Plus tard, Collette et ses collègues ont utilisé une approche similaire au double-hybride pour trouver des inhibiteurs de l'interaction Nef:Hck [94]. Un criblage virtuel ayant comme cible la poche de Nef liant la boucle RT de SFK a été utilisé suivi d'études double-hybride pour identifier le composé D1 (aussi appelé D14) (*figure 3B*), qui inhibe l'interaction entre Nef et le domaine SH3 de Hck (Hck-SH3) et se lie à Nef avec une forte affinité *in vitro* (micromolaire). Dans des cellules exprimant Nef, D1 rétablit partiellement les niveaux du MHC-I à la surface cellulaire sans moduler le niveau de CD4. Un criblage secondaire des dérivés de D1 a identifié le DLC27 comme étant un inhibiteur de l'interaction entre Nef:Hck-SH3 (*figure 3B*). Ce composé DLC27 se lie à Nef au même domaine liant la boucle RT confirmant le mécanisme de cette molécule. Ainsi, le DLC27 est un inhibiteur orthostérique de Nef. Des études subséquentes ont tenté d'améliorer l'affinité de DLC27 pour Nef en allongeant son groupement apolaire *tert*-butylphényle [95]. En utilisant cette stratégie, un analogue de DLC27, le DLC27-14, a été identifié (*figure 3B*) inhibant l'interaction *in vitro* entre Nef:Hck-SH3 avec une meilleure affinité. De plus, le DLC27 et le DLC27-14 déstabiliseraient la structure tertiaire de Nef et augmenteraient sa protéolyse par la protéase du VIH-1 *in vitro*, suggérant que ces inhibiteurs dégradent Nef. Dans une autre étude, le DLC27-14, utilisé en culture cellulaire, inhibe la réplication virale sans toutefois avoir un effet sur l'infectivité [96].

Des efforts supplémentaires ont été déployés par le groupe de Smithgall pour identifier et améliorer les inhibiteurs de l'interaction Nef:SFK. Ils ont développé un grand nombre d'essais pour évaluer l'interaction Nef:SFK. Initialement, des essais kinases *in vitro* de transfert d'énergie par résonance de type Förster (*Förster resonance energy transfer*, FRET), communément appelés Z'-LYTE, ont été adaptés pour identifier les composés qui interfèrent avec l'activation de Hck par Nef [97]. Le criblage Z'-LYTE a été initialement utilisé sur approximativement 10 000 composés pour identifier une série de quatre composés DFPs (*4-amino substituted diphenylfuopyrimidines*), appelés DFP-4AB, DFP-4AP et DFP-4APF, qui réduisent l'activation de Hck et Lyn par Nef, en plus de réduire la réplication du VIH-1 avec une puissance micromolaire. Une étude subséquente a confirmé l'inhibition de l'activation de Hck par Nef ainsi que celle de l'activation de SFK endogène en plus d'une inhibition de la réplication du VIH-1 possédant plusieurs sous-types de Nef du groupe M [98]. Notamment, les composés DFP avaient une structure similaire à une série de composés inhibant la tyrosine kinase qui se lient au site actif de la Lck suggérant ainsi que les inhibiteurs DFP ont une fonction similaire et inhibent directement la SFK. Bien que les composés DFP inhibaient modérément l'activité des kinases Hck et Lyn en l'absence de Nef, la présence de Nef augmentait l'inhibition des kinases de manière significative. Les études subséquentes ont identifié que l'association Nef:Hck modifiait la configuration du site actif des kinases pouvant peut-être ainsi promouvoir l'association des DFP au site actif [99, 100].

Les essais Z'LYTE Nef:Hck ont été réutilisés pour évaluer au-delà de 220 000 composés dans le but d'identifier les composés qui pourraient s'associer à Nef plutôt qu'à SFK [101]. Ces criblages ont permis d'identifier l'hydroxypyrazole, B9 (*figure 3C*) qui inhibe l'association Nef:Hck et l'activation du SFK endogène en plus d'inhiber la réplication virale de plusieurs sous-types de Nef du groupe M testés à des concentrations nanomolaires à micromolaires. En culture cellulaire, B9 atténue l'infectivité à des concentrations micromolaires. Toutefois, B9 bloque l'activité SFK de Hck, Lyn and c-*Src* en l'absence de Nef. Des études de résonance des plasmons de surface (*surface plasmon resonance*, SPR) ont identifié que B9 se lie à Nef avec une affinité nanomolaire tandis que des études d'amarrage indiquent que B9 peut se lier à une poche située à l'interface de dimérisation de Nef (*figure 3D*) en plus d'autres poches. Cette poche de dimérisation de B9 a été confirmée par des expériences de BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*) où B9 inhibait le BiFC à une concentration micromolaire. D'autres études ont rapporté que B9 rétablissait la présence de CD4 à la surface cellulaire et inhibait l'activation des TFK, I κ k

(interleukin-2-inducible T-cell kinase) et Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) [69, 102, 103].

Dans le but d'améliorer le profil pharmacocinétique des composés et de remplacer des groupements chimiques dans le noyau hydroxypyrazole, soient les groupes des azo, nitro et thioamide, d'autres études ont identifié une variété d'analogues de B9 [104, 105]. Deux analogues de B9, où le lien azo a été remplacé par des ponts d'éthylène ou de méthylène se sont avérés prometteurs [105]. Ces analogues de B9, initialement appelés composé 2 et 4 (*figure 3C*) et ensuite renommés JZ-96-21 et JZ-97-21, maintiennent une grande affinité nanomolaire pour Nef, inhibent la réplication virale à une concentration micromolaire, réduisent l'infektivité, ne sont pas cytotoxiques et ont une grande biodisponibilité orale chez les souris en comparaison au B9. Une étude ultérieure a aussi identifié que JZ-96-21 pouvait inhiber l'activation des TFK, Itk et Btk par Nef [69]. Récemment, un effort considérable a été déployé pour améliorer le B9 résultant ainsi à la synthèse de 216 analogues de B9 contenant plusieurs substitutions au niveau de l'hydroxypyrazole [103]. Les auteurs ont identifié six composés puissants (FC-7902, FC-7943, FC-7976, FC-8052, FC-8517, FC-8698 ; *figure 3C*) qui se lient à Nef avec des affinités picomolaire/nanomolaire, réduisent l'infektivité du VIH-1 à des concentrations micromolaires, inhibent la réplication du VIH-1 avec des puissances nanomolaires et qui ne sont nullement cytotoxiques. Plusieurs inhibiteurs ont aussi été découverts avec la capacité d'inhiber l'activation de Itk et Hck par Nef (FC-7902, FC-7943, FC-8052, FC-8517, FC-8698) en plus d'inhiber le contrôle de l'activité de Nef sur le MHC-I avec une plus forte puissance par rapport au B9 (FC-7902, FC-7943, FC-7976, FC-8007, FC-8052, FC-8517, FC-8698, FC-8700).

D'autres criblages ont aussi été effectués par le groupe Smithgall. Premièrement, un essai testant l'inhibition de la croissance chez la levure a été développé pour cribler des petites molécules [96]. Dans cet essai, la co-expression de Nef et de Hck dans les levures induit l'activation de Hck de manière constitutive pour ainsi inhiber la croissance des levures. Avec ce même essai, près de 2500 composés ont été criblés, suivi d'un deuxième criblage pour dépister l'inhibition de la réplication du VIH-1. Ces analyses ont permis la découverte du composé DQBS (*figure 3C*) qui inhibe, en culture cellulaire et à des concentrations micromolaires, l'effet de Nef sur Hck, l'activation endogène de SFK, la formation du complexe Nef:SFK:ZAP-70/Syk:PI3K et la diminution du MHC-I à la surface cellulaire. La réplication virale du VIH-1 a également été inhibée par le DQBS lorsque des Nef provenant de divers sous-types du groupe M ont été utilisés. Notons ici que le DQBS n'a pas été en mesure d'inhiber l'activité des kinases Hck ou

de ZAP-70 en l'absence de Nef et que le DQBS se lie à Nef *in vitro*, mais à des concentrations élevées. Des études d'amarrage avec le DQBS suggèrent que celui-ci se lie à une poche formée à la surface de dimérisation de Nef et à d'autres poches, comme le B9 et ses analogues, mais cela n'a pas été testé. Finalement, dans une autre étude, un essai d'homodimérisation par BiFC a été utilisé pour cribler 1597 composés pour trouver des inhibiteurs de la dimérisation de Nef [106]. Ce criblage a identifié le composé E11 qui réduit l'homodimérisation de Nef par BiFC à une concentration micromolaire. Ces résultats n'ont toutefois jamais été validés par d'autres expériences.

Récemment, plusieurs inhibiteurs, décrits ci-haut, ont été utilisés pour tester si l'inhibition de la diminution du MHC-I par Nef pouvait améliorer l'élimination des cellules latentes infectées par le VIH-1 par les CTL [107]. Plus précisément, le DQBS, le B9 et les dérivés JZ-96-21 et JZ-97-21 (*figure 3C*) ont été testés en co-culture avec des cellules primaires T CD4⁺ latentes infectées par le VIH-1 et des cellules CTL anti-VIH-1 provenant d'un donneur infecté. Lors de cette expérience, l'addition de chaque inhibiteur à des concentrations nanomolaires à micromolaires a amélioré l'élimination des cellules infectées par le VIH-1 par les CTL. De plus, 23 des 26 donneurs testés ont répondu au traitement utilisant le B9 avec une augmentation de l'élimination des cellules infectées. Lorsque les inhibiteurs ont été administrés en deux doses, l'élimination des cellules infectées par le VIH-1 a été considérablement améliorée avec 80-90 % de diminution des cellules Gag⁺ résiduelles en comparaison avec les cellules non traitées. Ensemble, ces résultats démontrent que l'inhibition de la capacité de Nef à réduire le MHC-I à la surface cellulaire est une approche viable pour stimuler l'élimination des cellules infectées lors de tentatives de guérison du VIH-1.

Finalement, l'équipe de Thomas a rapporté une petite molécule phénolique, 2c (*figure 3B*), qui inhibe, en culture cellulaire et à des concentrations micromolaires, l'interaction de Nef avec Hck et c-Src, perturbe la formation du complexe de Nef:SFK:ZAP-70/Syk:PI3K et rétablit les niveaux du MHC-I à la surface cellulaire sans moduler les niveaux du CD4 [59]. Le composé 2c a été identifié, lors d'une étude précédente, comme étant un inhibiteur de plusieurs interactions impliquant des motifs polyprolines et des domaines SH3 [108]. Des études de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire évaluant l'interaction Nef:2c ont suggéré que 2c se lie à Nef principalement au niveau d'une poche à l'extrémité C-terminale qui n'est pas associée avec l'activation de SFK ou avec la déplétion du MHC-I. Ceci suggère donc que le 2c est un inhibiteur allostérique de l'interaction Nef:SFK (*figure 3A*). Par contre, une inhibition orthostérique de l'interaction Nef:SFK a aussi

été suggérée où 2c se lie à l'hélice polyproline de Nef (*figure 3A*). D'autres études sur 2c ont démontré que ce composé inhibe la réplication et l'infectivité du VIH-1 en présence de Nef à des concentrations micromolaires tandis que des études d'amarrage prédisaient que 2c se lierait à la poche de Nef liant la boucle RT [90]. Malgré tout, 2c a été utilisé avec succès pour démontrer le rétablissement des niveaux du MHC-I en présence de Nef, mais son développement comme application thérapeutique a stagné dû à sa toxicité et aux concentrations élevées requises pour son utilisation.

Des petites molécules qui agissent sur la déplétion du MHC-I par Nef

Récemment, deux inhibiteurs ont été découverts agissant sur la déplétion du MHC-I par Nef sans toutefois dépendre de l'inhibition de l'activation des SFK. Premièrement, l'équipe de Li a utilisé la cytométrie de flux pour cribler 1600 composés homologués par la FDA pour trouver des composés qui rétablissent les niveaux du MHC-I en présence de Nef [109]. Ce criblage a identifié la lovastatine, une statine (*figure 4A*), qui a rétabli les niveaux de MHC-I, CD4 et SERINC5 à la surface des cellules et ce, à des concentrations micromolaires. La lovastatine inhibe également l'infectivité du VIH-1 et induit l'élimination par les CTL. Des études d'amarrage suggèrent que la lovastatine, dans sa forme promédicament (anneau fermé) ou dans sa forme en anneau ouvert, se lie à une poche à l'interface de Nef:AP-1 μ l (*figure 4B*). En effet, des études SPR ont montré que la lovastatine se lie à Nef avec une grande affinité micromolaire et que cette affinité est réduite lorsque des résidus de Nef situés dans la région d'interaction prédite sont modifiés. De plus, la lovastatine inhibe la co-immunoprécipitation entre AP-1 et Nef. Toutefois, la lovastatine agit principalement comme un inhibiteur de la réductase de HMG-CoA (*3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A*) [110] compliquant ainsi son utilisation comme inhibiteur de Nef *in vivo*. Ceci est particulièrement vrai lorsque nous considérons les concentrations micromolaires requises pour inhiber Nef en culture cellulaire.

Récemment, l'équipe de Collins a effectué un criblage de petites molécules sur la base du niveau du MHC-I à la surface cellulaire dans des cellules exprimant Nef à l'aide de la cytométrie de flux [111]. Même si un criblage initial de plus de 200 000 petites molécules n'a pas identifié de composés viables, des criblages ultérieurs de produits naturels contenant plus de 20 000 composés ont identifié 11 extraits microbiens capables de rétablir les niveaux du MHC-I à la surface cellulaire. De ces extraits, la concanamycine A et la bafilomycine plecomacrolide ont rétabli le niveau original du MHC-I observé en l'absence de Nef, avec le plus grand effet pour la concanamycine A (*figure 4C*). En

effet, lorsque Nef est exprimé dans les cellules, la concanamycine A rétablit les niveaux du MHC-I à la surface cellulaire sans moduler le CD4 avec plusieurs sous-types de Nef appartenant au groupe M et ce, à une concentration picomolaire/nanomolaire. De plus, la concanamycine A stimule l'élimination des cellules T CD4⁺ infectées par le VIH-1 lors d'une expérience de co-culture avec des CTL anti-VIH-1. Des études sur les mécanismes d'action de la concanamycine A ont suggéré que celle-ci ne suivait pas un mécanisme biologique conventionnel d'inhibition de la V-ATPase (*vacuolar-type ATPase*), qui réduit l'acidification lysosomale [112], dû au fait que les concentrations requises pour le rétablissement du MHC-I étaient inférieures à celles requises pour moduler l'acidification et la dégradation lysosomale. Dans ce contexte, la concanamycine A réduit plutôt la formation du complexe de Nef:MHC-I:AP-1 impliqué dans le trafic membranaire du MHC-I sans toutefois se lier au complexe Nef:MHC-I:AP-1, ni en réduisant les interactions entre le MHC-I et AP-1 ou Nef *in vitro*. Donc, la concanamycine A pourrait inhiber un autre facteur, comme le complexe multi-kinase Nef:SFK:ZAP-70/Syk:PI3K.

Des petites molécules inhibant d'autres fonctions de Nef

Un des premiers criblages pour trouver des inhibiteurs de Nef a utilisé un test immuno-enzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) [113]. Cette technique a testé la capacité des guanidines alcaloïdes à inhiber les interactions entre Nef et p53, l'actine ou le Lck. Cette approche a identifié trois guanidines alcaloïdes, analogues des familles de la batzelladine et de la crambescidine, dénommées composés 14, 17 et 22 (*figure 4D*) qui inhibent les interactions avec Nef à des concentrations micromolaires. Par contre, la toxicité de ces composés a empêché la poursuite d'autres études en culture cellulaire.

De manière différente, l'équipe de Bukrinsky a identifié des inhibiteurs de Nef qui modulent le transport du cholestérol, une cible qui pourrait être d'une grande valeur lors du traitement des conditions chroniques associées à l'infection par le VIH-1. En effet, Nef pourrait être responsable, en partie, des niveaux élevés de dyslipidémie et d'athérosclérose observés chez les PLWH [114]. Ceci est peut-être dû à l'effet de Nef qui dérègle le transport du cholestérol en inhibant la protéine ABCA1 (*ATP-binding cassette A1*) [115]. Ainsi, les auteurs ont identifié que le mécanisme de l'inhibition de ABCA1 serait dépendant de l'interaction de Nef avec la protéine calnexine [116]. En effectuant un criblage virtuel de 130 000 composés, les auteurs ont identifié la petite molécule NSC13987 (aussi nommé ZINC03953858) (*figure 4E*) qui bloque

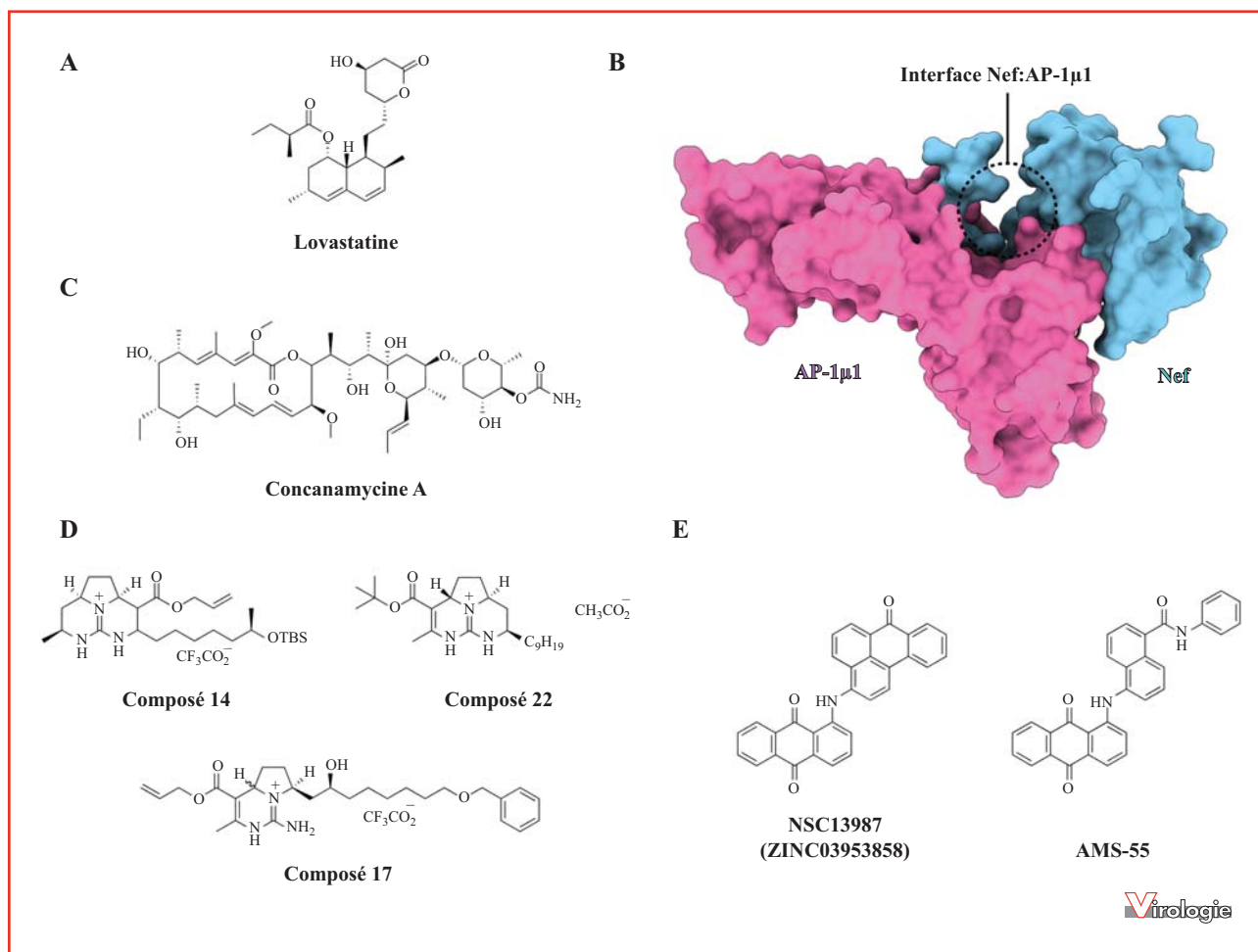


Figure 4. Petites molécules inhibant Nef. (A) La lovastatine, composé inhibant le complexe Nef:AP-1 (*adaptor protein 1*) dans sa forme anneau fermé. (B) Aperçu de l'interaction entre Nef (bleu) et la sous-unité μ 1 de AP-1 (rose) avec la surface proposée d'interaction de la lovastatine à l'interface du complexe Nef:AP-1 μ 1. La représentation a été effectuée avec le programme UCSF ChimeraX [136] en utilisant la structure cristallographique de NL4-3 Nef en complexe avec AP-1 μ 1 et le domaine cytoplasmique du complexe majeur de l'histocompatibilité de classe I (*major histocompatibility complex class I*, MHC-I) (PDB : 4EMZ) [137]. (C) Structure de la concanamycine A, un inhibiteur de Nef sur la déplétion du MHC-I. (D) Structures des analogues alcaloïdes qui inhibent les interactions entre Nef et p53, Lck (*lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*) ou l'actine. (E) Structure de l'inhibiteur NSC13987 et son dérivé AMS-55 qui inhibent le complexe Nef:calnexine.

l'interaction Nef:calnexine et le transport du cholestérol à des concentrations micromolaires [117]. De plus, ce composé réduit la réplication du VIH-1 en culture cellulaire. Une étude d'amarrage à l'aide d'un modèle du complexe Nef:calnexine a identifié le dérivé AMS-55 (*figure 4E*), qui rétablit les niveaux d'ABCA1 à des concentrations micromolaires et qui devrait être plus soluble que le NSC13987 [118]. Des criblages utilisant l'amarrage ont identifié d'autres inhibiteurs du complexe Nef:ABCA1, mais ces composés n'ont toutefois pas été testés en dehors du contexte virtuel [119].

Finalement, l'analogue de nucléoside, triciribine, a la capacité d'inhiber la réplication du VIH-1 sans toutefois agir sur la transcriptase inverse, l'intégrase ou la protéase [120, 121]. Toutefois, des études sur des mutations causées par la résistance à la triciribine ont détecté des mutations dans le gène *nef* [121]. Par contre, la liaison entre la triciribine et Nef n'a jamais été testée et il est fort probable que les effets antiviraux de cette molécule soient dus à l'inhibition d'Akt [122]. Comme Nef peut activer Akt [123, 124], les mutations, causées par la résistance, pourraient s'accumuler dans le gène *nef* pour ainsi compenser l'effet d'inhibition

de la triciribine sur Akt, quoique cette hypothèse reste à être testée.

Des inhibiteurs de Nef : peptides et protéines

Plusieurs inhibiteurs de Nef identifiés à ce jour sont des peptides et des protéines. Quoique leur application thérapeutique soit plus limitée, ces agents sont très spécifiques et considérés comme des outils d'envergure pour étudier les fonctions de Nef en culture cellulaire et *in vivo*. Plusieurs peptides et domaines SH3 ont été synthétisés et utilisés pour étudier l'interaction Nef:SH3 et son rôle durant l'infection [90, 125-128]. De plus, des anticorps et des inhibiteurs de type protéines de fusion ont également été répertoriés. Un anticorps à domaine unique α -Nef de camélidé, sdAb19, se lie à Nef à des concentrations nanomolaires et l'empêche de réduire les niveaux de CD4 à la surface cellulaire [129]. Il a les mêmes effets sur plusieurs Nef provenant des groupes M, N, O et P sans toutefois moduler les niveaux de MHC-I et il affecte également la réplication et l'infektivité virale. De plus, sdAb19 a inhibé l'interaction Nef:PAK2 tout en inversant les effets en aval sur le remodelage de l'actine. Finalement, dans un modèle murin de Nef, sdAb19 a inhibé les effets de Nef sur la maturation et l'activation des cellules T CD4⁺. Développée parallèlement, une nouvelle approche d'inhibition consiste à fusionner Nef avec ses protéines de liaison pour envelopper Nef et bloquer son activité [130]. Ces protéines de fusion, contenant la queue cytoplasmique de CD4 et le domaine SH3 de Hck, se lient à Nef à des concentrations nanomolaires de faibles à élevées, inhibent la capacité de Nef à moduler les niveaux de CD4, MHC-I et CCR5 et inhibent également l'infektivité en culture cellulaire.

La combinaison de ces deux stratégies a permis d'identifier les Neffins, des protéines de fusion de sdAb19 et des domaines Hck SH3 [131, 132]. Les Neffins se lient fortement à Nef avec des affinités picomolaires à faibles nanomolaires et inhibent plusieurs fonctions de Nef dont l'interaction et l'activation de Hck, la modulation de CD4 et du MHC-I, la relocalisation de Lck et l'infektivité en culture cellulaire. Les Neffins peuvent également interférer avec plusieurs fonctions de Nef dans les macrophages comme la phagocytose, la fusion cellulaire et la fonction des podocytes. Une base structurale pour déterminer le mode d'action des Neffins a indiqué que le domaine SH3 de Hck se lie au motif polyproline de Nef et à la boucle de liaison RT, tandis que sdAb19 se lie à l'extrémité C-terminale de Nef à l'opposé de la surface de liaison SH3 [133]. De plus, *in vitro*, les Neffins forment un complexe quaternaire 2:2 Nef:Neffin qui pourrait refléter un mécanisme de liaison intracellulaire imprévu pour les Neffins.

Dans d'autres criblages basés sur l'interaction entre Nef et sdAb19, un essai de fluorescence adapté à un échantillon

de composés de LOPAC (*library of pharmacologically active compounds*) a permis de trouver des inhibiteurs de Nef:sdAb19 [134]. Ces composés n'ont toutefois pas été testés. Un essai de fluorescence similaire a été appliqué dans un criblage pilote de LOPAC pour trouver des inhibiteurs de Nef:Hck [135].

Développements futurs

D'énormes efforts de plusieurs groupes ont permis d'identifier des inhibiteurs de Nef. Ces efforts se sont principalement concentrés sur l'effet de Nef sur le MHC-I, plus précisément sur les complexes Nef:SFK. Ceci n'est pas surprenant, car ce type d'inhibiteur peut potentiellement agir sur la guérison en modulant l'activation et l'élimination ou la vaccination thérapeutique. Par contre, moins d'efforts ont été déployés pour trouver des inhibiteurs de Nef modulant le CD4 ou l'activation de PAK2, malgré le fait que ces inhibiteurs pourraient avoir un effet important sur la guérison. Des études récentes démontrent que les inhibiteurs de Nef qui modulent le MHC-I augmentent l'élimination des cellules infectées par les CTL.

Après deux décennies d'efforts, il n'existe pas d'inhibiteur parfait, spécifique, sans toxicité possédant des propriétés pharmacocinétiques favorables. Tandis que quelques inhibiteurs peuvent être considérés comme des outils facilitant le développement d'autres molécules, l'optimisation *in vivo* reste complexe. Alors, le développement d'inhibiteurs possédant un profil pharmacocinétique favorable devrait être une priorité pour des études *in vivo*. Il faudrait aussi s'assurer que les prochaines études utilisent des souches de VIH-1 provenant de patients évitant ainsi la caractérisation d'inhibiteurs de souches de VIH-1 adaptées au laboratoire. Ces études sont importantes pour développer des thérapies et pour s'assurer que celles-ci produisent des effets dans une majorité d'individus. La difficulté à produire des petites molécules qui inhibent Nef nous oblige donc à prioriser des approches alternatives. Ainsi, comme Nef utilise plusieurs sites pour se lier à ses partenaires, il serait peut-être idéal de trouver des méthodes pour dégrader Nef par des molécules chimères qui assurent la protéolyse de Nef ou agissent comme colles moléculaires.

Malgré ces limites, plusieurs pistes existent et ce, grâce aux nombreuses découvertes. Ainsi, les inhibiteurs de Nef peuvent élargir nos connaissances sur les interactions entre Nef et les protéines de l'hôte comme les TFK et PAK2. De plus, les inhibiteurs de Nef nous permettent de mieux comprendre l'apoptose, l'autophagie et la signalisation dans les cellules T, des fonctions de Nef qui restent très peu comprises. L'étude de ces processus pourrait élargir nos connaissances sur la latence et la résistance aux CTL.

Finalement, il reste impératif de tester des inhibiteurs de Nef dans des modèles de guérison pour ainsi établir si ces molécules peuvent contribuer à une guérison efficace du VIH-1.

Conclusion

Après vingt ans de progrès, plusieurs inhibiteurs ciblant diverses fonctions et phénotypes de Nef ont été décrits. Cependant, l'inhibiteur idéal qui est spécifique, efficace et qui maintient un profil pharmacocinétique favorable avec peu de toxicité n'existe toujours pas. L'identification et l'optimisation de nouvelles molécules et une meilleure compréhension des fonctions de Nef devraient amener ce domaine vers des études *in vivo*. Avec ces percées, nous pensons que les inhibiteurs de Nef, seront importants dans la guérison du VIH-1.

Remerciements. Ces travaux dans le laboratoire de JDD sont financés par les Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC # 389413). AL est le récipiendaire d'une bourse d'études des Instituts de recherche en santé du Canada.

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

Références

1. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, *et al.* HIV infection. *Nat Rev Dis Primers* 2015 ; 1 : 15035.
2. Chun T-W, Davey RT, Engel D, *et al.* Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature* 1999 ; 401 : 874-5.
3. 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.
4. Mills EJ, Nachega JB, Buchan I, *et al.* Adherence to antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa and North America: a meta-analysis. *JAMA* 2006 ; 296 : 679-90.
5. Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med* 2011 ; 62 : 141-55.
6. Deeks SG, Lewin SR, Havlir DV. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet* 2013 ; 382 : 1525-33.
7. Herek GM, Capitanio JP, Widaman KF. HIV-related stigma and knowledge in the United States: prevalence and trends, 1991-1999. *Am J Public Health* 2002 ; 92 : 371-7.
8. Rueda S, Mitra S, Chen S, *et al.* Examining the associations between HIV-related stigma and health outcomes in people living with HIV/AIDS: a series of meta-analyses. *BMJ Open* 2016 ; 6 : e011453.
9. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). *2020 Global AIDS Update – Seizing the moment – Tackling entrenched inequalities to end epidemics*. UNAIDS, 2020. <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2020/global-aids-report> [cited 2021].

10. Choudhary SK, Margolis DM. Curing HIV: pharmacologic approaches to target HIV-1 latency. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011 ; 51 : 397-418.
11. Deeks SG. Shock and kill. *Nature* 2012 ; 487 : 439-40.
12. Vansant G, Bruggemans A, Janssens J, *et al.* Block-and-lock strategies to cure HIV infection. *Viruses* 2020 ; 12 : 84.
13. Stephenson KE. Therapeutic vaccination for HIV: hopes and challenges. *Curr Opin HIV AIDS* 2018 ; 13 : 408-15.
14. Qi J, Ding C, Jiang X, *et al.* Advances in developing CAR T-cell therapy for HIV cure. *Front Immunol* 2020 ; 11 : 361.
15. Margolis DM, Koup RA, Ferrari G. HIV antibodies for treatment of HIV infection. *Immunol Rev* 2017 ; 275 : 313-23.
16. Hoang TN, Paiardini M. Role of cytokine agonists and immune checkpoint inhibitors toward HIV remission. *Curr Opin HIV AIDS* 2019 ; 14 : 121-8.
17. Delannoy A, Poirier M, Bell B. Cat and mouse: HIV transcription in latency, immune evasion and cure/remission strategies. *Viruses* 2019 ; 11 : 269.
18. Collins DR, Gaiha GD, Walker BD. CD8⁺ T cells in HIV control, cure and prevention. *Nat Rev Immunol* 2020 ; 20 : 471-82.
19. Abner E, Jordan A. HIV “shock and kill” therapy: in need of revision. *Antiviral Res* 2019 ; 166 : 19-34.
20. Kim Y, Anderson JL, Lewin SR. Getting the “kill” into “shock and kill”: strategies to eliminate latent HIV. *Cell Host Microbe* 2018 ; 23 : 14-26.
21. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, *et al.* HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998 ; 391 : 397-401.
22. Pawlak EN, Dikeakos JD. HIV-1 Nef: a master manipulator of the membrane trafficking machinery mediating immune evasion. *Biochim Biophys Acta* 2015 ; 1850 : 733-41.
23. Fackler OT, Baur AS. Live and let die: Nef functions beyond HIV replication. *Immunity* 2002 ; 16 : 493-7.
24. Wolf D, Witte V, Laffert B, *et al.* HIV-1 Nef associated PAK and PI3-Kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals. *Nat Med* 2001 ; 7 : 1217-24.
25. Gelezianas R, Xu W, Takeda K, *et al.* HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature* 2001 ; 410 : 834-8.
26. Castro-Gonzalez S, Shi Y, Colomer-Lluch M, *et al.* HIV-1 Nef counteracts autophagy restriction by enhancing the association between BECN1 and its inhibitor BCL2 in a PRKN-dependent manner. *Autophagy* 2021 ; 17 : 553-77.
27. Markle TJ, Mwimanzu P, Brockman MA. HIV-1 Nef and T-cell activation: a history of contradictions. *Future Virol* 2013 ; 8 : 391-404.
28. Abraham L, Fackler OT. HIV-1 Nef: a multifaceted modulator of T cell receptor signaling. *Cell Commun Signal* 2012 ; 10 : 39.
29. Kirchhoff F. Immune evasion and counteraction of restriction factors by HIV-1 and other primate lentiviruses. *Cell Host Microbe* 2010 ; 8 : 55-67.
30. Foster JL, Garcia JV. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology* 2008 ; 5 : 84.
31. Kestler HW, Ringler DJ, Mori K, *et al.* Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 1991 ; 65 : 651-62.
32. Skowronski J, Parks D, Mariani R. Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. *EMBO J* 1993 ; 12 : 703-13.

33. Brady HJ, Pennington DJ, Miles CG, *et al.* CD4 cell surface downregulation in HIV-1 Nef transgenic mice is a consequence of intracellular sequestration. *EMBO J* 1993; 12 : 4923-32.
34. Lindemann D, Wilhelm R, Renard P, *et al.* Severe immunodeficiency associated with a human immunodeficiency virus 1 Nef/3'-long terminal repeat transgene. *J Exp Med* 1994; 179 : 797-807.
35. Hanna Z, Kay DG, Rebai N, *et al.* Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 1998; 95 : 163-75.
36. Jamieson BD, Aldrovandi GM, Planelles V, *et al.* Requirement of human immunodeficiency virus type 1 nef for *in vivo* replication and pathogenicity. *J Virol* 1994; 68 : 3478-85.
37. Zou W, Denton PW, Watkins RL, *et al.* Nef functions in BLT mice to enhance HIV-1 replication and deplete CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *Retrovirology* 2012; 9 : 44.
38. Watkins RL, Foster JL, Garcia JV. *In vivo* analysis of Nef's role in HIV-1 replication, systemic T cell activation and CD4⁺ T cell loss. *Retrovirology* 2015; 12 : 61.
39. Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, *et al.* Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 1995; 270 : 988-91.
40. Learmont JC, Geczy AF, Mills J, *et al.* Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1 – a report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med* 1999; 340 : 1715-22.
41. Zaunders J, Dyer WB, Churchill M, *et al.* Possible clearance of transfusion-acquired nef/LTR-deleted attenuated HIV-1 infection by an elite controller with CCR5 Δ32 heterozygous and HLA-B57 genotype. *J Virus Erad* 2019; 5 : 73-83.
42. Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, *et al.* Absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1995; 332 : 228-32.
43. Garcia JV, Miller AD. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 1991; 350 : 508-11.
44. Aiken C, Konner J, Landau NR, *et al.* Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 1994; 76 : 853-64.
45. Rosa A, Chande A, Ziglio S, *et al.* HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* 2015; 526 : 212-7.
46. Usami Y, Wu Y, Göttlinger HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 2015; 526 : 218-23.
47. Mumby MJ, Johnson AL, Trothen SM, *et al.* An amino acid polymorphism within the HIV-1 Nef dileucine motif functionally uncouples cell surface CD4 and SERINC5 downregulation. *J Virol* 2021; 95 : e0058821.
48. Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, *et al.* Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 1996; 2 : 338-42.
49. Dirk BS, Pawlak EN, Johnson AL, *et al.* HIV-1 Nef sequesters MHC-I intracellularly by targeting early stages of endocytosis and recycling. *Sci Rep* 2016; 6 : 37021.
50. Johnson AL, Dirk BS, Coutu M, *et al.* A highly conserved residue in HIV-1 Nef alpha helix 2 modulates protein expression. *mSphere* 2016; 1 : e00288-16.
51. daSilva LLP, Sougrat R, Burgos PV, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein targets CD4 to the multivesicular body pathway. *J Virol* 2009; 83 : 6578-90.
52. Kwon Y, Kaake RM, Echeverria I, *et al.* Structural basis of CD4 downregulation by HIV-1 Nef. *Nat Struct Mol Biol* 2020; 27 : 822-8.
53. Wildum S, Schindler M, Münch J, *et al.* Contribution of Vpu, Env and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J Virol* 2006; 80 : 8047-59.
54. Veillette M, Desormeaux A, Medjahed H, *et al.* Interaction with cellular CD4 exposes HIV-1 envelope epitopes targeted by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Virol* 2014; 88 : 2633-44.
55. Staudt RP, Smithgall TE. Nef homodimers down-regulate SERINC5 by AP-2-mediated endocytosis to promote HIV-1 infectivity. *J Biol Chem* 2020; 295 : 15540-52.
56. Blagoveshchenskaya AD, Thomas L, Feliciangeli SF, *et al.* HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell* 2002; 111 : 853-66.
57. Atkins KM, Thomas L, Youker RT, *et al.* HIV-1 Nef binds PACS-2 to assemble a multikinase cascade that triggers major histocompatibility complex class I (MHC-I) down-regulation: analysis using short interfering RNA and knock-out mice. *J Biol Chem* 2008; 283 : 11772-84.
58. Hung C-H, Thomas L, Ruby CE, *et al.* HIV-1 Nef assembles a Src family kinase-ZAP-70/Syk-PI3K cascade to downregulate cell-surface MHC-I. *Cell Host Microbe* 2007; 1 : 121-33.
59. Dikeakos JD, Atkins KM, Thomas L, *et al.* Small molecule inhibition of HIV-1-induced MHC-I down-regulation identifies a temporally regulated switch in Nef action. *Mol Biol Cell* 2010; 21 : 3279-92.
60. Kasper MR, Roeth JF, Williams M, *et al.* HIV-1 Nef disrupts antigen presentation early in the secretory pathway. *J Biol Chem* 2005; 280 : 12840-8.
61. Schaefer MR, Wonderlich ER, Roeth JF, *et al.* HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common β-COP-dependent pathway in T cells. *PLoS Pathog* 2008; 4 : e1000131.
62. Swigut T. Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *EMBO J* 2001; 20 : 1593-604.
63. Pawlak EN, Dirk BS, Jacob RA, *et al.* The HIV-1 accessory proteins Nef and Vpu downregulate total and cell surface CD28 in CD4⁺ T cells. *Retrovirology* 2018; 15 : 6.
64. Chaudhry A, Das SR, Hussain A, *et al.* The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *J Immunol* 2005; 175 : 4566-74.
65. Michel N, Allespach I, Venzke S, *et al.* The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. *Curr Biol* 2005; 15 : 714-23.
66. Venzke S, Michel N, Allespach I, *et al.* Expression of Nef downregulates CXCR4, the major coreceptor of human immunodeficiency virus, from the surfaces of target cells and thereby enhances resistance to superinfection. *J Virol* 2006; 80 : 11141-52.
67. Jacob RA, Edgar CR, Prévost J, *et al.* The HIV-1 accessory protein Nef increases surface expression of the checkpoint receptor Tim-3 in infected CD4⁺ T cells. *J Biol Chem* 2021; 297 : 101042.
68. Tarafdar S, Poe JA, Smithgall TE. The accessory factor Nef links HIV-1 to Tec/Btk kinases in an Src homology 3 domain-dependent manner. *J Biol Chem* 2014; 289 : 15718-28.
69. Li WF, Aryal M, Shu ST, *et al.* HIV-1 Nef dimers short-circuit immune receptor signaling by activating Tec-family kinases at the host cell membrane. *J Biol Chem* 2020; 295 : 5163-74.
70. Renkema GH, Manninen A, Mann DA, *et al.* Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2. *Curr Biol* 1999; 9 : 1407-11.
71. Haller C, Rauch S, Fackler OT. HIV-1 Nef employs two distinct mechanisms to modulate Lck subcellular localization and TCR induced actin remodeling. *PLoS One* 2007; 2 : e1212.

72. Smith BL, Krushelnycky BW, Mochly-Rosen D, *et al.* The HIV Nef protein associates with protein kinase C theta. *J Biol Chem* 1996; 271: 16753-7.
73. Swingler S, Mann A, Jacqué J-M, *et al.* HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat Med* 1999; 5: 997-1003.
74. Lee J-H, Schierer S, Blume K, *et al.* HIV-Nef and ADAM17-containing plasma extracellular vesicles induce and correlate with immune pathogenesis in chronic HIV infection. *EBioMedicine* 2016; 6: 103-13.
75. Jacob RA, Johnson AL, Pawlak EN, *et al.* The interaction between HIV-1 Nef and adaptor protein-2 reduces Nef-mediated CD4⁺ T cell apoptosis. *Virology* 2017; 509: 1-10.
76. Finzi D. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997; 278: 1295-300.
77. 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: 512-7.
78. Spina CA, Kwoh TJ, Chowers MY, *et al.* The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 115-23.
79. Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, *et al.* The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med* 1994; 179: 101-13.
80. Fujinaga K, Zhong Q, Nakaya T, *et al.* Extracellular Nef protein regulates productive HIV-1 infection from latency. *J Immunol* 1995; 155: 5289-98.
81. Kuang XT, Brockman MA. Implications of HIV-1 Nef for “shock and kill” strategies to eliminate latent viral reservoirs. *Viruses* 2018; 10: 677.
82. Arenaccio C, Anticoli S, Manfredi F, *et al.* Latent HIV-1 is activated by exosomes from cells infected with either replication-competent or defective HIV-1. *Retrovirology* 2015; 12: 87.
83. Deng K, Perteau M, Rongvaux A, *et al.* Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations. *Nature* 2015; 517: 381-5.
84. Huang S-H, Ren Y, Thomas AS, *et al.* Latent HIV reservoirs exhibit inherent resistance to elimination by CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* 2018; 128: 876-89.
85. Zhou D, Hayashi T, Jean M, *et al.* Inhibition of Polo-like kinase 1 (PLK1) facilitates the elimination of HIV-1 viral reservoirs in CD4⁺ T cells *ex vivo*. *Sci Adv* 2020; 6: eaba1941.
86. Lenassi M, Cagney G, Liao M, *et al.* HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4⁺ T cells. *Traffic* 2010; 11: 110-22.
87. Kaw S, Ananth S, Tsopoulidis N, *et al.* HIV-1 infection of CD4 T cells impairs antigen-specific B cell function. *EMBO J* 2020; 39: e105594.
88. Triple RP, Emert-Sedlak L, Smithgall TE. HIV-1 Nef selectively activates Src family kinases Hck, Lyn, and c-Src through direct SH3 domain interaction. *J Biol Chem* 2006; 281: 27029-38.
89. Saksela K, Cheng G, Baltimore D. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef⁺ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J* 1995; 14: 484-91.
90. Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Mwimanzu P, *et al.* The identification of a small molecule compound that reduces HIV-1 Nef-mediated viral infectivity enhancement. *PLoS One* 2011; 6: e27696.
91. Lee CH, Saksela K, Mirza UA, *et al.* Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain. *Cell* 1996; 85: 931-42.
92. Moarefi I, LaFevre-Bernt M, Sicheri F, *et al.* Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 1997; 385: 650-3.
93. Murakami Y, Fukazawa H, Kobatake T, *et al.* A mammalian two-hybrid screening system for inhibitors of interaction between HIV Nef and the cellular tyrosine kinase Hck. *Antiviral Res* 2002; 55: 161-8.
94. Betzi S, Restouin A, Opi S, *et al.* Protein protein interaction inhibition (2P2I) combining high throughput and virtual screening: application to the HIV-1 Nef protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 19256-61.
95. Lugari A, Breuer S, Coursindel T, *et al.* A specific protein disorder catalyzer of HIV-1 Nef. *Bioorg Med Chem* 2011; 19: 7401-6.
96. Triple RP, Narute P, Emert-Sedlak LA, *et al.* Discovery of a diaminoquinoline benzenesulfonamide antagonist of HIV-1 Nef function using a yeast-based phenotypic screen. *Retrovirology* 2013; 10: 135.
97. Emert-Sedlak L, Kodama T, Lerner EC, *et al.* Chemical library screens targeting an HIV-1 accessory factor/host cell kinase complex identify novel antiretroviral compounds. *ACS Chem Biol* 2009; 4: 939-47.
98. Narute PS, Smithgall TE. Nef alleles from all major HIV-1 clades activate Src-family kinases and enhance HIV-1 replication in an inhibitor-sensitive manner. *PLoS One* 2012; 7: e32561.
99. Pene-Dumitrescu T, Shu ST, Wales TE, *et al.* HIV-1 Nef interaction influences the ATP-binding site of the Src-family kinase, Hck. *BMC Chem Biol* 2012; 12: 1.
100. Wales TE, Hochrein JM, Morgan CR, *et al.* Subtle dynamic changes accompany Hck activation by HIV-1 Nef and are reversed by an antiretroviral kinase inhibitor. *Biochemistry* 2015; 54: 6382-91.
101. Emert-Sedlak LA, Narute P, Shu ST, *et al.* Effector kinase coupling enables high-throughput screens for direct HIV-1 Nef antagonists with antiretroviral activity. *Chem Biol* 2013; 20: 82-91.
102. Shu ST, Emert-Sedlak LA, Smithgall TE. Cell-based fluorescence complementation reveals a role for HIV-1 Nef protein dimerization in AP-2 adaptor recruitment and CD4 co-receptor down-regulation. *J Biol Chem* 2017; 292: 2670-8.
103. Shi H, Tice CM, Emert-Sedlak L, *et al.* Tight-binding hydroxypyrazole HIV-1 Nef inhibitors suppress viral replication in donor mononuclear cells and reverse Nef-mediated MHC-I downregulation. *ACS Infect Dis* 2020; 6: 302-12.
104. Iyer PC, Zhao J, Emert-Sedlak LA, *et al.* Synthesis and structure-activity analysis of diphenylpyrazolodiazene inhibitors of the HIV-1 Nef virulence factor. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; 24: 1702-6.
105. Emert-Sedlak LA, Loughran HM, Shi H, *et al.* Synthesis and evaluation of orally active small molecule HIV-1 Nef antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 2016; 26: 1480-4.
106. Poe JA, Vollmer L, Vogt A, *et al.* Development and validation of a high-content bimolecular fluorescence complementation assay for small-molecule inhibitors of HIV-1 Nef dimerization. *J Biomol Screen* 2014; 19: 556-65.
107. Mujib S, Saiyed A, Fadel S, *et al.* Pharmacologic HIV-1 Nef blockade promotes CD8 T cell-mediated elimination of latently HIV-1-infected cells in vitro. *JCI Insight* 2017; 2: e93684.
108. Oneyama C, Agatsuma T, Kanda Y, *et al.* Synthetic inhibitors of proline-rich ligand-mediated protein-protein interaction: potent analogs of UCS15A. *Chem Biol* 2003; 10: 443-51.
109. Liu B, Zhang X, Zhang W, *et al.* Lovastatin inhibits HIV-1-induced MHC-I downregulation by targeting Nef-AP-1 complex formation: a new strategy to boost immune eradication of HIV-1 infected cells. *Front Immunol* 2019; 10: 2151.

110. Alberts AW. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am J Cardiol* 1988 ; 62 : 10J-5J.
111. Painter MM, Zimmerman GE, Merlino MS, *et al.* Concanamycin A counteracts HIV-1 Nef to enhance immune clearance of infected primary cells by cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020 ; 117 : 23835-46.
112. Huss M, Ingenhorst G, König S, *et al.* Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the V_o subunit c. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 40544-8.
113. Olszewski A, Sato K, Aron ZD, *et al.* Guanidine alkaloid analogs as inhibitors of HIV-1 Nef interactions with p53, actin, and p56^{lck}. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ; 101 : 14079-84.
114. Sviridov D, Mukhamedova N, Makarov AA, *et al.* Comorbidities of HIV infection: role of Nef-induced impairment of cholesterol metabolism and lipid raft functionality. *AIDS* 2020 ; 34 : 1-13.
115. Mujawar Z, Rose H, Morrow MP, *et al.* Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *PLoS Biol* 2006 ; 4 : e365.
116. Jennelle L, Hunegnaw R, Dubrovsky L, *et al.* HIV-1 protein Nef inhibits activity of ATP-binding cassette transporter A1 by targeting endoplasmic reticulum chaperone calnexin. *J Biol Chem* 2014 ; 289 : 28870-84.
117. Hunegnaw R, Vassilyeva M, Dubrovsky L, *et al.* Interaction between HIV-1 Nef and calnexin: from modeling to small molecule inhibitors reversing HIV-induced lipid accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016 ; 36 : 1758-71.
118. Adzhubei AA, Anashkina AA, Tkachev YV, *et al.* Modelling interaction between HIV-1 Nef and calnexin. *AIDS* 2018 ; 32 : 2103-11.
119. Adzhubei AA, Kulkarni A, Tolstova AP, *et al.* Direct interaction between ABCA1 and HIV-1 Nef: molecular modeling and virtual screening for inhibitors. *Comput Struct Biotechnol J* 2021 ; 19 : 3876-84.
120. Kucera LS, Iyer NP, Puckett SH, *et al.* Activity of triciribine and triciribine-5' -monophosphate against human immunodeficiency virus types 1 and 2. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993 ; 9 : 307-14.
121. Ptak RG, Gentry BG, Hartman TL, *et al.* Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by triciribine involves the accessory protein nef. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 ; 54 : 1512-9.
122. Yang L, Dan HC, Sun M, *et al.* Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res* 2004 ; 64 : 4394-9.
123. Xue M, Yao S, Hu M, *et al.* HIV-1 Nef and KSHV oncogene K1 synergistically promote angiogenesis by inducing cellular miR-718 to regulate the PTEN/AKT/mTOR signaling pathway. *Nucleic Acids Res* 2014 ; 42 : 9862-79.
124. Kumar A, Abbas W, Colin L, *et al.* Tuning of AKT-pathway by Nef and its blockade by protease inhibitors results in limited recovery in latently HIV infected T-cell line. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 24090.
125. Chang AH, O'Shaughnessy MV, Jirik FR. Hck SH3 domain-dependent abrogation of Nef-induced class I MHC down-regulation. *Eur J Immunol* 2001 ; 31 : 2382-7.
126. Hiiipakka M, Poikonen K, Saksela K. SH3 domains with high affinity and engineered ligand specificities targeted to HIV-1 Nef. *J Mol Biol* 1999 ; 293 : 1097-106.
127. Hiiipakka M, Huotari P, Manninen A, *et al.* Inhibition of cellular functions of HIV-1 Nef by artificial SH3 domains. *Virology* 2001 ; 286 : 152-9.
128. Stangler T, Tran T, Hoffmann S, *et al.* Competitive displacement of full-length HIV-1 Nef from the Hck SH3 domain by a high-affinity artificial peptide. *Biol Chem* 2007 ; 388 : 611-5.
129. Bouchet J, Basmaciogullari SE, Chrobak P, *et al.* Inhibition of the Nef regulatory protein of HIV-1 by a single-domain antibody. *Blood* 2011 ; 117 : 3559-68.
130. Breuer S, Schievink SI, Schulte A, *et al.* Molecular design, functional characterization and structural basis of a protein inhibitor against the HIV-1 pathogenicity factor Nef. *PLoS One* 2011 ; 6 : e20033.
131. Bouchet J, Herate C, Guenzel CA, *et al.* Single-domain antibody-SH3 fusions for efficient neutralization of HIV-1 Nef functions. *J Virol* 2012 ; 86 : 4856-67.
132. Järviuoma A, Strandin T, Lülfi S, *et al.* High-affinity target binding engineered via fusion of a single-domain antibody fragment with a ligand-tailored SH3 domain. *PLoS One* 2012 ; 7 : e40331.
133. Lülfi S, Matz J, Rouyez M-C, *et al.* Structural basis for the inhibition of HIV-1 Nef by a high-affinity binding single-domain antibody. *Retrovirology* 2014 ; 11 : 24.
134. Fan X, Wei J, Xiong H, *et al.* A homogeneous time-resolved fluorescence-based high-throughput screening for discovery of inhibitors of Nef-sdAb19 interaction. *Int J Oncol* 2015 ; 47 : 1485-93.
135. Breuer S, Espinola S, Morelli X, *et al.* A biochemical/biophysical assay dyad for HTS-compatible triaging of inhibitors of the HIV-1 Nef/Hck SH3 interaction. *Curr Chem Genom Transl Med* 2013 ; 7 : 16-20.
136. Goddard TD, Huang CC, Meng EC, *et al.* UCSF ChimeraX: meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci* 2018 ; 27 : 14-25.
137. Jia X, Singh R, Homann S, *et al.* Structural basis of evasion of cellular adaptive immunity by HIV-1 Nef. *Nat Struct Mol Biol* 2012 ; 19 : 701-6.