



HAL
open science

Caractérisation moléculaire de l'inhibition de la transcription du VIH dépendante de Tat par la spironolactone

Benoît Lacombe

► **To cite this version:**

Benoît Lacombe. Caractérisation moléculaire de l'inhibition de la transcription du VIH dépendante de Tat par la spironolactone. Virologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB137 . tel-02141708

HAL Id: tel-02141708

<https://theses.hal.science/tel-02141708>

Submitted on 28 May 2019

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-DESCARTES

PREPAREE A L'INSTITUT COCHIN

SOUS LA DIRECTION DU **DR CECILIA RAMIREZ**

ECOLE DOCTORALE N° 562 (Bio Sorbonne Paris Cité)

Spécialité de doctorat : Virologie

Par

Mr Benoît Lacombe

**Caractérisation moléculaire de l'inhibition de la
transcription du VIH dépendante de Tat par la
Spironolactone**

Thèse présentée et soutenue le 28 septembre 2016

Composition du Jury :

Président	Pr Uriel Hazan : PU – ENS Cachan/Université Paris Saclay
Rapporteur	Dr Rosemary Kiernan : DR – CNRS
Rapporteur	Dr Nicolas Le May : CR – INSERM
Examineur	Dr Stéphane Emiliani : DR – CNRS
Examineur	Dr Christian Schwartz : MCU – Université Strasbourg
Directeur de thèse	Dr Cecilia Ramirez : CR – CNRS

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-DESCARTES

PREPAREE A L'INSTITUT COCHIN

SOUS LA DIRECTION DU **DR CECILIA RAMIREZ**

ECOLE DOCTORALE N° 562 (Bio Sorbonne Paris Cité)

Spécialité de doctorat : Virologie

Par

Mr Benoît Lacombe

**Caractérisation moléculaire de l'inhibition de la
transcription du VIH dépendante de Tat par la
Spironolactone**

Thèse présentée et soutenue le 28 septembre 2016

Composition du Jury :

Président	Pr Uriel Hazan : PU – ENS Cachan/Université Paris Saclay
Rapporteur	Dr Rosemary Kiernan : DR – CNRS
Rapporteur	Dr Nicolas Le May : CR – INSERM
Examineur	Dr Stéphane Emiliani : DR – CNRS
Examineur	Dr Christian Schwartz : MCU – Université Strasbourg
Directeur de thèse	Dr Cecilia Ramirez : CR – CNRS

Aux choix qui ont conduit à cet instant

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury, le Pr Uriel Hazan, le Dr Nicolas Le May, le Dr Rosemary Kiernan, le Dr Christian Schwartz et le Dr Stéphane Emiliani pour avoir accepté d'évaluer ce travail et le temps qu'ils ont consacré à ce manuscrit.

Je tiens tout d'abord à remercier les Dr Florence Margottin-Goguet et Dr Claudine Pique de m'avoir permis de rejoindre leur laboratoire pour mon Master et ensuite pour ma Thèse. Je tiens à les remercier pour leurs conseils, les discussions scientifiques et toutes les choses qu'elles m'ont transmises durant cette période.

Je voudrais remercier tout particulièrement le Dr Cecilia Ramirez d'avoir accepté de me supporter sans me connaître. Merci d'avoir eu confiance en moi durant toute cette période qui fut ponctuée d'heures de débats scientifiques, de prévisions de manips et de négociations en tout genre. Merci de m'avoir transmis toutes ces connaissances, cette autonomie que tu m'as donnée et pour toutes ces choses qui m'ont permis d'accomplir ce projet très intéressant qui j'espère continuera encore pour un certain temps.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire, actuels et passés, car grâce à tous ces gens qui arrivent et partent, l'environnement dans lequel nous sommes évolue constamment et nous donne de nouvelles perspectives. Je remercie tout particulièrement Marina pour m'avoir grandement aidé pendant ma thèse. Merci au Dr Groussaud qui a du me supporter au laboratoire et souvent même en dehors. Merci pour tous ces moments qui font que le monde de la recherche n'est pas seulement scientifique.

Je souhaite également remercier ma famille pour son soutien et pour sa présence permanente tout au long de cette période qui n'est pas toujours évidente. Merci à eux pour leur écoute et leurs conseils qui sont souvent les plus judicieux du fait que ce sont les personnes qui nous connaissent le mieux.

Merci également à Clara qui m'a connu durant cette période spéciale de ma vie et qui a partagé tous ces moments avec moi. Les moments durant une thèse ne sont pas toujours évidents et c'est bien d'avoir une personne qui te comprend et t'écoute en connaissance de cause.

Enfin, un grand merci à mes amis de Nice qui ont souvent été un repère et un soutien important face aux décisions que l'on doit prendre au quotidien. Cette amitié qui te fait te sentir chez toi juste en voyant le nom des personnes s'afficher sur ton téléphone. Merci à tous.

ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES	19
RESUMES	21
INTRODUCTION	23
1 - L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH)	24
1.1 – GENERALITES	25
1.1.1 – <i>Découverte et mode de transmission</i>	25
1.1.2 – <i>Les différentes souches</i>	27
1.1.3 – <i>Physiopathologie de l'infection virale</i>	29
1.1.4 – <i>Structure du génome viral</i>	31
1.1.5 – <i>Le cycle de réplication virale</i>	33
1.2 – TRANSCRIPTION DU VIH ET ROLE DE LA PROTEINE TAT	39
1.2.1 – <i>Initiation de la transcription virale</i>	41
1.2.2 – <i>Echappement du promoteur et pause transcriptionnelle</i>	43
1.2.3 – <i>Elongation de la transcription virale</i>	45
1.2.4 – <i>Latence virale</i>	47
1.3 – FACTEURS INHIBITEURS ET COFACTEURS DE LA REPLICATION VIRALE	49
1.3.1 – <i>Les facteurs inhibiteurs de la multiplication du virus</i>	51
1.3.2 – <i>Les facteurs facilitateurs ou cofacteurs du virus</i>	57
1.3.2 – <i>Les hélicases dans le cycle de réplication virale</i>	59
2 – LE COMPLEXE TFIIF ET SON HELICASE XPB	64
2.1 – LE COMPLEXE TFIIF CHEZ L'HOMME.....	65
2.1.1 – <i>Composition de TFIIF</i>	67
2.2 – ROLE DE TFIIF DANS LA CELLULE	71
2.2.1 – <i>TFIIF dans la transcription</i>	73
2.2.2 – <i>TFIIF dans la réparation de l'ADN</i>	75
2.2.3 – <i>Conséquences de la dualité transcription/réparation de TFIIF</i>	81
2.2.4 – <i>Relation connue entre XPB et le VIH</i>	83
3 – LA SPIRONOLACTONE, INHIBITEUR SPECIFIQUE DE LA PROTEINE XPB	86
3.1 – ROLE ET DESCRIPTION DE LA MOLECULE.....	87
3.1.1 – <i>Histoire et découverte de la spironolactone</i>	87
3.1.2 – <i>Rôle de la spironolactone</i>	89
3.1.3 – <i>Voie de l'aldostérone</i>	91
3.1.4 – <i>Les inhibiteurs de l'aldostérone</i>	95
3.1.5 – <i>La spironolactone en dehors de la voie de l'aldostérone</i>	97
3.1.6 – <i>La spironolactone et les cellules cibles du VIH</i>	99
4 – LES MOLECULES ANTIRETROVIRALES : INHIBITEURS DU VIH	103
4.1 – LES INHIBITEURS DE L'ENTREE ET DE LA FUSION VIRALE	103
4.1.1 – <i>Les inhibiteurs de la liaison virus cellule</i>	105
4.1.2 – <i>Les inhibiteurs de la fusion virale</i>	107
4.2 – LES INHIBITEURS DES ENZYMES VIRALES	108
4.2.1 – <i>Les inhibiteurs de la transcriptase inverse</i>	109

4.2.2 – Les inhibiteurs de l'intégrase	111
4.2.3 – Les inhibiteurs de la protéase	113
4.3 – LES INHIBITEURS DE LA TRANSCRIPTION VIRALE	115
4.3.1 – Inhibition des cofacteurs de la transcription	115
4.3.2 – Inhibition l'interaction entre Tat/TAR.....	117
OBJECTIFS	123
RESULTATS	125
1 – RESULTATS PREALABLES.....	126
1.1 – DEGRADATION DE LA PROTEINE XPB PAR LA SP	127
1.2 – ROLE DE LA SP SUR DES CELLULES TRANSDUITES PAR UN PSEUDOVIRUS HIV-CMV-GFP.....	129
1.3 – ROLE DE LA SP SUR DES CELLULES TRANSDUITES PAR UN PSEUDOVIRUS HIV-LTR-LUC.....	129
2 – ETUDE : ROLES DE LA SP ET DE LA PROTEINE XPB DANS L'INFECTION DES LYMPHOCYTES T PAR LE VIH (LACOMBE ET AL.).....	131
3 – RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	137
3.1 – PRODUCTION VIRALE EN PRESENCE DE SP	161
3.2 – EFFET DE LA SP EN PRESENCE DE MOLECULES ANTIRETROVIRALES	162
3.3 – QUELLE EST L'ETAPE CIBLEE PAR LA SPIRONOLACTONE?	163
3.4 – ROLE DE LA SPIRONOLACTONE SUR UN AUTRE RETROVIRUS, LE VIRUS HTLV	164
DISCUSSION	168
1 – ROLE DE LA PROTEINE XPB DANS L'INFECTION PAR LE VIH	169
2 – ROLE DU COMPLEXE TFIIF DANS L'INFECTION VIRALE	173
3 – ROLE DE LA SPIRONOLACTONE DANS LA REPLICATION VIRALE	177
4 – ROLE DE LA SPIRONOLACTONE COMME MOLECULE ANTIRETROVIRALE.....	185
REFERENCES	193
ANNEXES	231

ABBREVIATIONS

7TS	7 α -thiométhyl-spironolactone
ADN	Acide désoxyribonucléique
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
ARN	Acide ribonucléique
ART	Traitements AntiRétroviraux (AntiRetroviral Therapy)
ATP	Adénosine TriPhosphate
AZT	Azidothymidine
BER	Base excision repair
BST2	Bone marrow stromal antigen 2
CAK	Cdk-activating kinase
CAN	Canrenone
CBP	CREB binding protein
CCR5	CC-chemokine receptor 5
CD4	Cluster de différenciation 4
CDK7	Cyclin-dependent kinase 7
CDK9	Cyclin-dependent kinase 9
CH25H	Cholestérol 25-hydroxylase
CMV	Cytomégalovirus
CREB	cAMP-response element-binding protein
CS	syndrome de Cockayne
CSA	CS groupe A
CSB	CS groupe B
CTD	C-terminal domain
dCA	Didéhydro-cortistatine A
DC	Cellules dendritiques
DCAF1	DDB1-Cul4A- associated factor-1
DRD	DNA damage recognition domain
DSIF	DRB sensitivity inducing factor
EBV	Virus Epstein-Barr
ENaC	Chaîne sodium des cellules épithéliales
EPL	Eplérénone
GGR	Réparation globale du génome
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GTF	Facteurs généraux de transcription
HAART	Thérapie antirétrovirale hautement active
HD	Domaine hélicase
HTLV	Human T-cell leukemia/lymphoma virus
IFN	Interféron
IgG	Immunoglobuline

LEDGF	Lens epithelium-derived growth factor
LTR	Long terminal repeat
MAT1	Ménage à trois 1
MMLV	Moloney Murine Leukemia virus
Mov 10	Moloney leukemia virus 10 homolog
MR	Récepteur des minéralocorticoïdes
Mx	Myxovirus resistance
Nef	Negative regulatory factor
NELF	Negative elongation factor
NER	Nucleotide excision repair
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NHEJ	Non-homologous DNA end joining
NLS	Signaux de localisation nucléaire
NNRTI	Inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcription inverse
NRTI	Inhibiteurs nucléosidiques de la transcription inverse
nSRE	Négatifs SRE
P-TEFb	Positive transcription elongation factor
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PIC	Complexe de pré-intégration
Pol II	ARN Polymérase II
R	Répétée
RCF	Replication Factor C
RED	R210-E211-D-212
Rev	Regulator of virion expression
RHA	RNA helicase A
RPA	Protéine de réplication A
RT	Transcriptase inverse (reverse transcriptase)
SAMHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
SGK1	Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1
SIDA	Syndrôme de l'immunodéficience humaine
SIV	Virus de l'immunodéficience simienne (Simian immunodeficiency virus)
SP	Spironolactone
Sp1	Specificity protein 1
SRE	Steroid response element
TAR	Trans activation response element
Tat	Trans activator of transcription
TBP	TATA binding proteins
TCR	Réparation couplée à la transcription
TFIIA	Transcription factor II A
TFIIB	Transcription factor II B
TFIID	Transcription factor II D
TFIIE	Transcription factor II E
TFIIF	Transcription factor II F
TFIIH	Transcription factor II H
Th	Lymphocytes T helper

ThM	Thumb
TPL	Triptolide
TRIM5 α	Tripartite motif-containing protein 5
TTD	Trichothiodystrophie
U3	Unique 3'
U5	Unique 5'
UV	Ultra-violet
Vif	Virion infectivity factor
VIH	Virus de l'immunodéficienc humaine
VIH-1	Virus de l'immunodéficienc humaine de type 1
VIH-2	Virus de l'immunodéficienc humaine de type 2
Vpr	Viral protein R
Vpu	Viral protein unique
Vpx	Viral protein X
WRN	Werner syndrome
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPA	Xeroderma Pigmentosum groupe A
XPB	Xeroderma Pigmentosum groupe B
XPC	Xeroderma Pigmentosum groupe C
XPD	Xeroderma Pigmentosum groupe D
XPF	Xeroderma Pigmentosum groupe F
XPG	Xeroderma Pigmentosum groupe G

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 Nombre d'infection par le VIH à travers le monde
- Figure 2 Phylogénie des différentes souches du SIV et du VIH
- Figure 3 Immunopathologie de l'infection virale au cours de la vie de personnes infectées
- Figure 4 Représentation schématique des génomes viraux du VIH-1 et du VIH-2 et de la particule virale
- Figure 5 Cycle de réplication du VIH au sein des cellules de l'immunité
- Figure 6 Représentation schématique du LTR 5' du VIH
- Figure 7 Représentation schématique de la transcription du VIH
- Figure 8 Les mécanismes potentiels conduisant à l'établissement de la latence du VIH
- Figure 9 Les principaux facteurs inhibiteurs du VIH et les étapes du cycle de réplication ciblées
- Figure 10 Rôle potentiel des hélicases cellulaires lors de la multiplication du VIH
- Figure 11 Composition du complexe TFIIH chez l'Homme
- Figure 12 Représentation schématique du gène de la protéine XPB humaine et ses différents domaines
- Figure 13 Fixation de la protéine XPB sur l'ADN et activation de son activité hélicase ATP-dépendante
- Figure 14 Mécanisme de transcription basale par l'ARN Pol II
- Figure 15 Mécanisme GGR de réparation de lésions causées par des agents exogènes
- Figure 16 Représentation de la formule chimique de la spironolactone
- Figure 17 Représentation de la formule chimique de l'éplérénone
- Figure 18 Représentation schématique simplifiée de l'action de l'aldostérone sur les cellules épithéliales
- Figure 19 Représentation schématique de la régulation des gènes par l'aldostérone et son récepteur
- Figure 20 Résumé des données pharmacologiques entre la spironolactone et l'éplérénone
- Figure 21 Schéma du mécanisme d'action des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH
- Figure 22 Schéma du mécanisme d'action des inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH
- Figure 23 Les antirétroviraux dans le cycle de réplication virale
- Figure 24 Représentation de la dCA
- Figure 25 Représentation de la TPL
- Figure 26 Effet de la SP sur différentes lignées cellulaires
- Figure 27 Effet de la SP sur les cellules Jurkat T
- Figure 28 La dégradation de la protéine XPB est liée au protéasome
- Figure 29 Effet de la SP sur les cellules transduites avec le pseudovirus HIV-CMV-GFP
- Figure 30 Effet de la SP sur les cellules transduites avec le virus HIV-LTR-Luc
- Figure 31 Effet de la SP sur la production virale et l'infectiosité
- Figure 32 Effet de la SP en combinaison avec des molécules antirétrovirales
- Figure 33 Effet de la SP sur la place de l'ARN Pol II sur le promoteur LTR du VIH
- Figure 34 Effet de la SP sur le promoteur LTR du virus HTLV et conséquences transcriptionnelles
- Figure 35 Comparaison des structures de molécules inhibitrices de la transcription virale
- Figure 36 Modélisation de l'effet de la SP sur la transcription du promoteur du VIH

RESUMES

Rôle de la protéine XPB et effet de la spironolactone lors de l'infection des cellules T par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

La spironolactone (SP), est un antagoniste de l'aldostérone, utilisée dans le traitement de l'hypertension. Le traitement de cellules par la SP induit la dégradation spécifique de la protéine XPB (Alekseev *et al.*, 2014). L'utilisation de la SP sur des lignées lymphocytaires (Jurkat T) et des lymphocytes primaires issus du sang (CD4+ activées), préalablement infectées par le VIH (type 1 ou type 2), entraîne une forte dégradation de la protéine XPB et une inhibition importante de l'infection virale. Pour confirmer la spécificité de la spironolactone sur la réplication du VIH, nous avons utilisé en parallèle l'éplérénone, analogue structurale de la spironolactone incapable de dégrader la protéine XPB. A contrario, lorsque l'on traite les cellules avec l'éplérénone, l'infection virale n'est pas inhibée. Par ailleurs, le traitement par la spironolactone a mis en évidence un effet sur l'activation de la transcription du promoteur LTR du VIH dépendante de Tat, effet qui n'est pas observé si le LTR est activé via des voies alternes (PMA et TNF). La quantification des ARN cellulaires et viraux a montré le rôle spécifique de l'action de la SP sur la transcription du promoteur LTR en présence de la protéine Tat. La spironolactone est incapable d'inhiber la transcription de promoteurs viraux différents du LTR du VIH. La spironolactone est également capable d'inhiber la réactivation de la transcription à partir du LTR du VIH dans un modèle contenant un provirus latent. Cette molécule ouvre de nouvelles perspectives concernant les molécules inhibitrices de la transcription virale et met en lumière le rôle de cofacteur de la protéine XPB dans l'infection par le VIH.

Mots-clés : VIH, spironolactone, XPB, LTR, transcription

Molecular characterization of a new Tat-dependent transcription inhibitor, the Spironolactone and role of the XPB protein in HIV replication

Spironolactone (SP) is an aldosterone antagonist used in hypertension treatment for many years. SP treatment is responsible for a rapid and specific degradation of the XPB protein (Alekseev *et al.*, 2014). Jurkat and primary CD4 + T cells infected by HIV-1 or HIV-2 and treated by SP show a strong degradation of the XPB protein and an important inhibition of viral infection. To confirm specificity of SP action on HIV, we have used a structural analogue of SP, Eplerenone (EPL), which can't degrade XPB. On the contrary, EPL is unable to inhibit infection of cells previously infected by HIV. Otherwise, SP inhibition of HIV seems to be specific of Tat dependent transcription from the HIV promoter, because activation of this promoter with PMA or TNF is not affected by SP. Quantification of viral and cellular RNA show that only LTR transcription is affected by SP. Transcription of other promoters was measured in presence of SP and Tat but no inhibition of gene transcription has been observed. Finally, SP is also able to inhibit HIV LTR reactivation from latently infected T cells. This drug appears as a new anti-HIV compound and gives new perspectives concerning transcriptional inhibitors of HIV replication. This molecule also highlights the cofactor role of XPB during HIV replication in natural target cells.

Keywords : HIV, spironolactone, XPB, LTR, transcription

INTRODUCTION

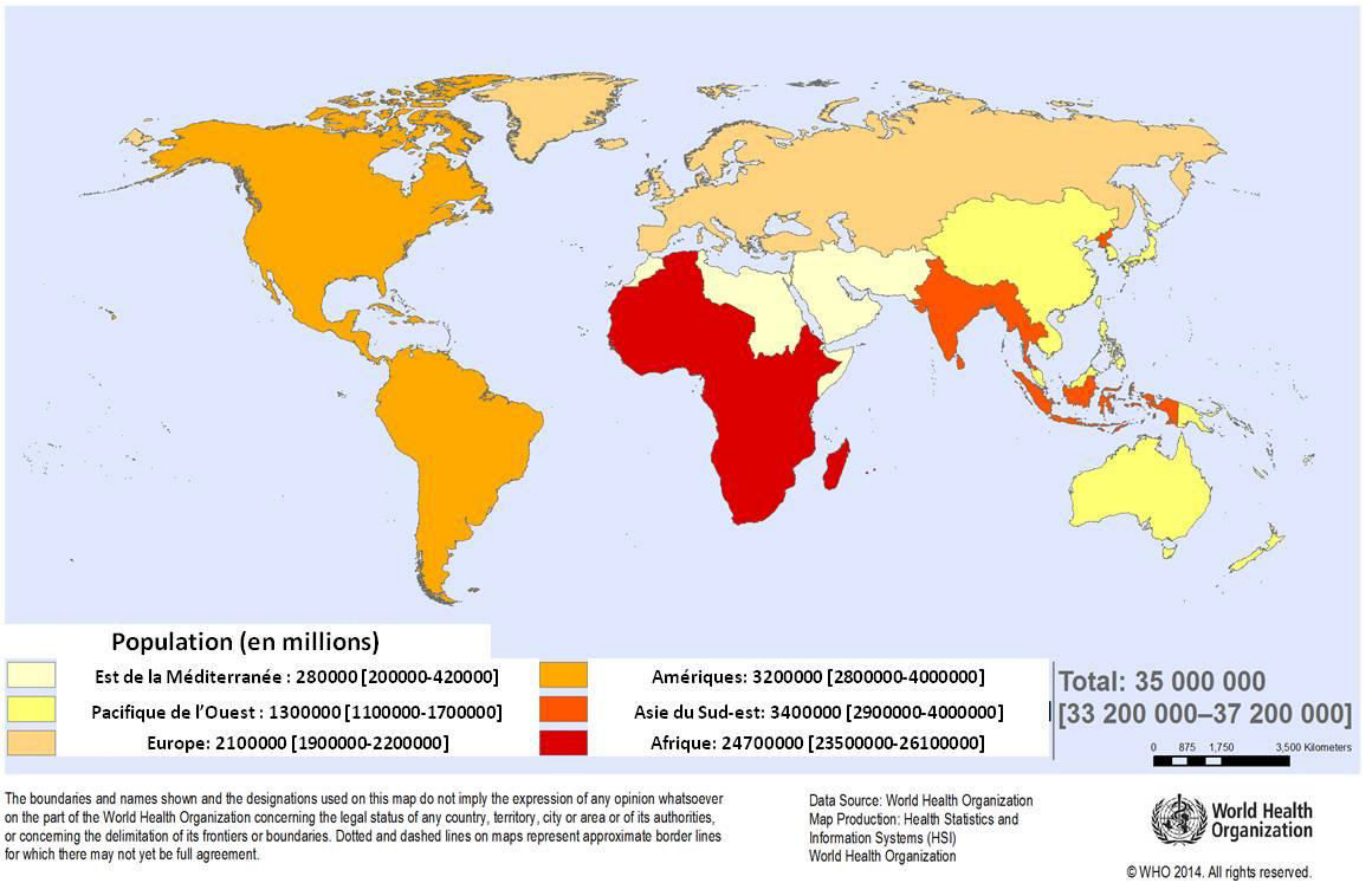


Figure 1 : Nombre de personnes infectées par le VIH à travers le monde. Carte représentant une estimation du nombre d'adultes et d'enfants infectés par le VIH sur les différents continents en 2013. Les régions les plus touchées par la pandémie du VIH sont l'Afrique, avec 25 millions de personnes porteuses du virus et dans une moindre mesure l'Asie avec environ 5 millions de personnes contaminées.

1 - L'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

1.1 – Généralités

1.1.1 – Découverte et mode de transmission

Le Syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) a été décrit comme un ensemble de symptômes consécutifs à la destruction des cellules lymphocytaires du système immunitaire de l'hôte. Son agent étiologique, le VIH, est responsable de la destruction des cellules infectées. De plus, certaines protéines excrétées par le virus sont également capables d'induire l'apoptose de cellules non infectées. Le virus a été identifié en 1983 (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983) et en 2008 cette découverte est récompensée par le Prix Nobel de Médecine aux Pr Françoise Barré-Sinoussi et Pr Luc Montagnier. Depuis les années 2000, on compte environ 38 millions de personnes nouvellement infectées. Sur la même période, 25 millions de personnes sont décédées de maladies liées à l'infection par le virus.

En 2013, on estimait à 37 millions le nombre de personnes vivant avec le virus (Figure 1) et parmi cette population, 40% ne connaissaient pas leur statut de séropositif. Au cours de cette même année, 2 millions de nouvelles infections ont été recensées. La région du monde la plus touchée par l'infection par le VIH est l'Afrique subsaharienne avec 25 millions de personnes vivant avec le virus. Cette région regroupe également le plus de nouvelles infections chaque année avec environ 70% des infections mondiales recensées en 2013.

Aujourd'hui, les traitements antirétroviraux (ART) proposés sont efficaces et permettent aux personnes infectées d'avoir une espérance de vie à la naissance proche de la moyenne. Malheureusement trop peu de personnes ont accès à ces médicaments car seulement 16 millions de personnes sur les 37 millions infectées par le virus reçoivent une thérapie antirétrovirale (ART) (Organisation Mondiale de la Santé - OMS, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/fr>).

La transmission du virus se fait par trois voies préférentielles : par transmission sexuelle, par transmission de sang contaminé entre deux individus et enfin par transmission materno-fœtale.

La grande majorité des nouvelles infections se fait par voie sexuelle lors de rapports non protégés chez les personnes hétérosexuelles et chez les personnes homosexuelles. La transmission du virus se fait lorsque des muqueuses de l'organisme entre en contact avec des sécrétions sexuelles ou sanguines infectées. Dans les sécrétions sexuelles, le virus est présent sous forme de particules libres

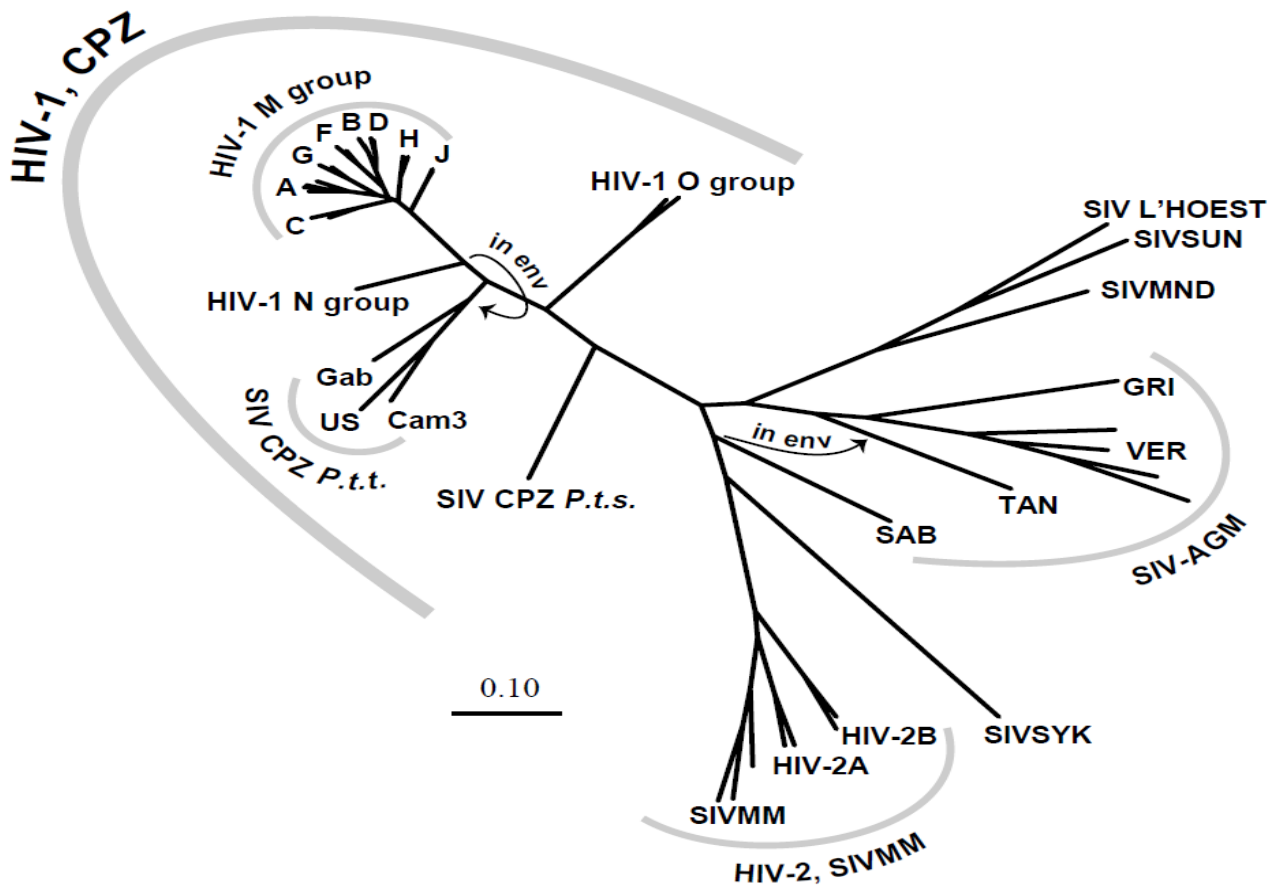


Figure 2 : Phylogénie des différentes souches du SIV et du VIH (Kuiken C.L., 1999). Pour le VIH-1 trois groupes sont caractérisés, le M (main – majoritaire), le O (outlier – cas particulier) et le N (non M – non O). Leur ancêtre SIVcpz possède également différents groupes et souches. Les souches GAB, US et Cam3 sont issues de SIVcpz P.t.t (Pan troglodytes troglodytes). Le second groupe provient de SIVcpz P.t.s (Pan troglodytes shweinfuthii). Le VIH-2 est issu de la souche SIVsm décrite ici par SIVmm (mangabeys – macaques). Quatre souches sont isolées dans différents singes ou groupe de singes, SIVsyk provenant de singes Sykes, SIV L'HOEST provenant de singes L'HOEST, SIVsun provenant de singes sun-tailed et SIVmnd provenant de mandrill. Enfin le groupe SIVagm (african green monkey), regroupe les souches SAB (Sabaeus), TAN (Tantalus), Ver (Vervet) et Gri (Grivet).

mais également sous forme intégré dans les cellules présentes dans ces fluides. Le risque de transmission entre une personne saine et une personne infectée dépend de la charge virale dans les sécrétions de cette dernière et du type de relation sexuelle.

La transmission sanguine concerne les usagers de drogues par intraveineuse ou les personnes transfusées. Pour les consommateurs de drogues, la transmission virale se fait lors de l'échange de seringues usagées contenant du sang de personnes infectées. Cette pratique entraîne également la transmission d'autres virus tels que les virus de l'hépatite B et C. Les transmissions par transfusion résultent de l'utilisation de facteurs de coagulation et de sang contaminés administrés aux patients dans les années entourant la découverte du virus.

Enfin la transmission materno-fœtale se fait minoritairement pendant des événements au cours des deux premiers trimestres de la grossesse lors d'un passage précoce du virus. En revanche, majoritairement lors de l'échange de fluides contaminés de la mère en contact avec l'enfant au moment de l'accouchement. La transmission peut encore se faire pendant le processus d'allaitement de l'enfant.

1.1.2 – Les différentes souches

Deux virus sont responsables de l'ensemble des infections à travers le monde, chacun se décomposant en différents sérotypes. Le VIH-2 a été découvert plus tardivement que le VIH-1, en 1986 (Clavel et al., 1986). Les points communs entre ces deux virus sont leur mode de transmission, leur répllication intracellulaire et les conséquences cliniques conduisant au SIDA (Marlink et al., 1994; van der Loeff et al., 2010). Il existe néanmoins des différences notables comme une charge virale plus faible chez les personnes infectées par le VIH-2 (Popper et al., 2000), une phase asymptomatique plus longue concernant le VIH-2 (Popper et al., 1999) et au niveau épidémiologique le VIH-2 est cantonné à l'Afrique de l'Ouest (Lemey et al., 2003) alors que la prévalence du VIH-1 est mondiale.

Historiquement, la différence entre le VIH-1 et le VIH-2 remonte à la transmission inter-espèces à partir du virus SIV (Simian Immunodeficiency Virus) entre le singe et l'homme (Sharp et al., 2001) (Figure 2). Le VIH-1 est issu de la transmission zoonotique d'une souche SIVcpz infectant les chimpanzés (Huet et al., 1990) alors que le VIH-2 provient d'une souche SIVsm infectant les singes mangabeyes (Hirsch et al., 1989). Les virus simiens n'induisent pas de syndrome d'immunodéficience chez leurs hôtes mais leurs transmissions à certaines espèces entraînent un tableau clinique de type SIDA. En particulier, l'infection de singes rhésus macaques par SIVsm a conduit à l'apparition du virus SIVmac qui induit un syndrome proche de celui décrit pour le SIDA (Hirsch et al., 1995).

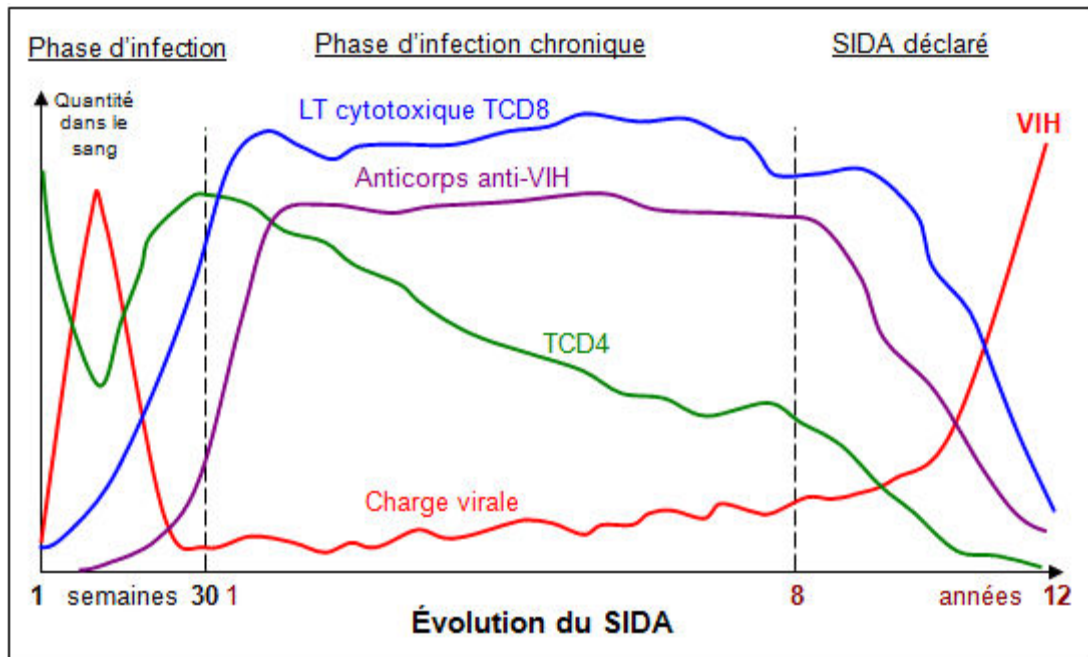


Figure 3 : Immunopathologie de l'infection virale au cours de la vie de personnes infectées. La phase d'infection est associée à des symptômes cliniques typiques du syndrome rétroviral aigu. Après plusieurs mois, la charge virale plasmatique est maintenue constante et le nombre de cellules T CD4+ se normalise. La phase chronique prolongée est cliniquement silencieuse, malgré des niveaux élevés de production virale. Le SIDA est caractérisé par l'apparition d'infections opportunistes associées au VIH. La contraction de maladies opportunistes augmente, de façon significative, lorsque le niveau de cellules T CD4+ tombe sous le seuil critique de 200/mm³. La diversité virale augmente en conformité avec le niveau toujours élevé de la réplication virale et le nombre d'erreurs de la transcription inverse.

Depuis la découverte des deux lignées lentivirales, VIH-1 et VIH-2, de nombreuses souches ont été caractérisées (Kuiken C.L., 1999). Il existe plus de souches identifiées pour le VIH-1 que pour le VIH-2. Les différentes souches de VIH-1 peuvent être classées en trois groupes, M, N et O. Le groupe M comporte le plus de souches identifiées et ces dernières sont responsables de la pandémie mondiale. Les groupes N et O comporte peu de virus qui sont majoritairement présents en Afrique de l'Ouest. Toutes ces souches ont pour ancêtre commun SIVcpz.

Ces trois groupes forment une diversité importante pour le VIH-1 et permet au virus d'avoir des réservoirs variés, de persister et de s'adapter aux conditions environnementales mais aussi de survivre à la pression de sélection imposée par les ART.

Concernant le VIH-2, deux sous types sont identifiés, le groupe A et le groupe B. Ces groupes sont issus de la dérive génétique de la souche SIVsm, ancêtre du VIH-2, présents majoritairement en Afrique de l'Ouest.

1.1.3 – Physiopathologie de l'infection virale

L'infection du VIH chez l'Homme est caractérisée par trois phases temporellement distinctes et variées. La primo-infection ne dure que quelques semaines puis on atteint une phase chronique et finalement le stade SIDA (Figure 3).

La phase d'infection survient peu après la transmission virale. Elle est caractérisée par une multiplication virale intense corrélée à la réponse immunitaire de l'hôte. Cette réponse se matérialise par l'augmentation de la production d'anticorps dirigés contre le virus et une réponse lymphocytaire T CD8 cytotoxique, parallèlement à une diminution du nombre de lymphocytes T CD4. Durant cette phase, le nombre de lymphocytes T CD4 et la charge virale donnent des indications quant à l'évolution de la maladie.

La phase chronique est également nommée asymptomatique. En absence de traitement, cette période peut durer une dizaine d'années et elle est caractérisée par une chute lente mais constante des lymphocytes T CD4 ainsi que par une faible réplication virale. La chute du niveau de lymphocytes T CD4 est due à la mort des cellules infectées mais également à l'induction de mécanisme apoptotique par les protéines virales sécrétées affectant les cellules « spectatrices » non infectées. Cette chute peut s'expliquer par le fait que les lymphocytes T CD4 sont les cibles majoritaires du virus mais constituent également les principaux réservoirs. Durant cette période, les anticorps anti-VIH et le nombre de lymphocytes T CD8 cytotoxiques sont maintenus à un niveau très haut et constant.

Le SIDA est déclaré lorsque le taux de lymphocytes T CD4 est faible et donc incapable d'être renouvelé par l'organisme. Cette diminution ouvre la porte aux différentes maladies opportunistes qui profitent de la faiblesse du système immunitaire. Le nombre de lymphocytes T CD4 continue de diminuer pour atteindre un niveau extrêmement faible. Ce niveau bas sera également observé pour la quantité d'anticorps anti-VIH et le nombre de lymphocytes T CD8 cytotoxiques, correspondant à une multiplication virale accrue et maximale.

Concernant la pathogénèse, l'infection est caractérisée par une réplication virale importante dans les tissus où siègent les lymphocytes et autres cellules immunitaires. Le virus est capable de s'adapter en réponse à son environnement grâce notamment à son niveau élevé de réplication, du nombre de virus et des erreurs produites lors de la transcription inverse. Les lymphocytes T CD4 sont les cibles principales du virus et leur nombre diminue constamment durant la phase chronique. Le nombre de CD4 diminue à cause de la lyse liée au virus et à la lyse spécifique de ces cellules par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Le nombre diminue aussi en réponse à l'induction des mécanismes d'apoptose et de pyroptose induits par le virus. La progression du virus et la réponse immunitaire sont différentes chez chaque individu en raison des interactions hôte-pathogènes et du polymorphisme entre les individus.

1.1.4 – Structure du génome viral

Le VIH-1 et le VIH-2 appartiennent au genre *Lentivirus* et font partie de la famille des *Retroviridae*. *Lentivirus* car ils sont caractérisés par une longue période d'incubation se traduisant par une évolution lente de la maladie. *Rétrovirus* car ils sont capables de transformer leur génome ARN (Acide ribonucléique) en ADN (Acide désoxyribonucléique) double brin s'intégrant au génome cellulaire. En effet, ils sont constitués d'un génome simple brin de type ARN diploïde c'est à dire qu'ils possèdent deux copies identiques de leur matrice, qui est de polarité positive.

Leurs génomes sont caractéristiques des rétrovirus, c'est-à-dire qu'ils possèdent plusieurs groupes de gènes flanqués par deux régions non codantes structurées, les LTR (Long terminal repeat). Les LTR présents en 5' et 3' du génome contiennent des séquences régulatrices ainsi que des structures indispensables à la transcription virale. Les protéines du VIH sont issues de la transcription, à partir du LTR 5', de cadres ouverts de lecture dont les ARN messagers synthétisés subissent différents mécanismes d'épissage. Ces divers mécanismes ainsi que l'évolution au contact de l'hôte, a permis au génome du virus de coder uniquement les éléments nécessaires au bon déroulement de sa réplication. Les protéines de structure codées par *gag* et *env* permettent la synthèse des constituants du core et de l'enveloppe virale. La polyprotéine Gag engendrera après clivage la matrice

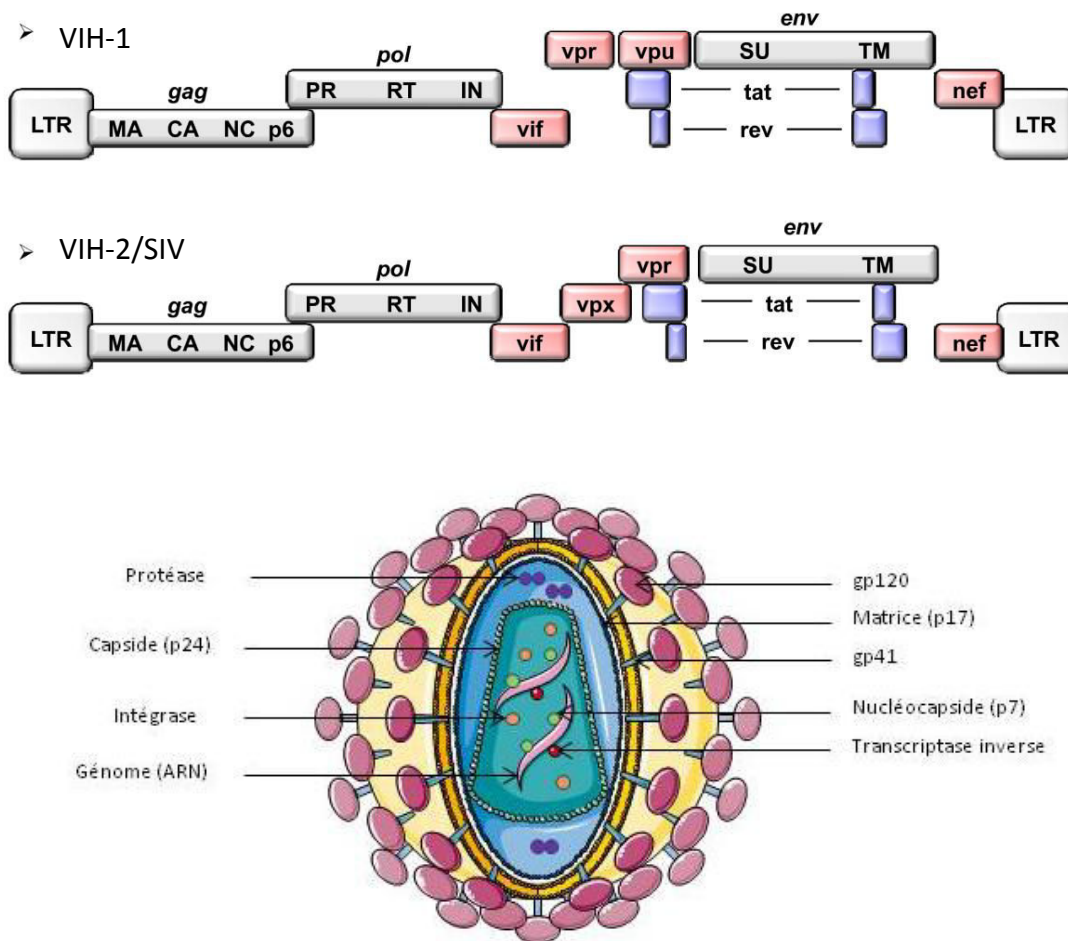


Figure 4 : Représentation schématique des génomes viraux du VIH-1 et du VIH-2 (adaptée de (Ayinde et al., 2010)) et de la particule virale. (Haut) En gris sont représentés les gènes codant pour les protéines de structure, d'enveloppe, les enzymes viraux ainsi que les promoteurs LTR aux extrémités 5' et 3' des virus. Les protéines régulatrices sont représentées en bleu et enfin les protéines auxiliaires sont identifiées en rouge. Les génomes viraux du VIH-2 et SIV contiennent les mêmes éléments, notamment la protéine auxiliaire Vpx, alors que le VIH-1 possède Vpu. (Bas) La particule virale est composée de la capsid, qui est entourée des protéines de matrice suivie de l'enveloppe avec ses spicules formées des protéines gp120 et gp41. Ces protéines d'enveloppe sont responsables de la reconnaissance et de la fusion virale au sein des cellules reconnues par le virus. La capsid comprend le génome viral, ARN diploïde de polarité positive et les enzymes viraux responsables des étapes précoces du cycle de réplication.

MAP17, la capsidie CAp24, la nucléocapsidie NCp7 et enfin la protéine p6. Le précurseur de la protéine d'enveloppe sera clivé en gp41 (TM) et gp120 (SU). Le gène *pol* regroupe les enzymes nécessaires à la réplication virale. La polyprotéine Pol sera divisée en trois, (i) la transcriptase inverse (RT) qui permet de synthétiser de l'ADN à partir de la matrice d'ARN présente dans la capsidie virale. (ii) L'intégrase (IN) favorise l'insertion du génome virale au sein du génome cellulaire et (iii) la protéase (PR) est nécessaire à la maturation des virions. Le dernier groupe de gènes code les protéines régulatrices Tat (*Transactivator of transcription*), Rev (*Regulator of virion expression*) et les protéines auxiliaires. Plus précisément, la protéine Tat est codée par deux exons non successifs dans le génome viral.

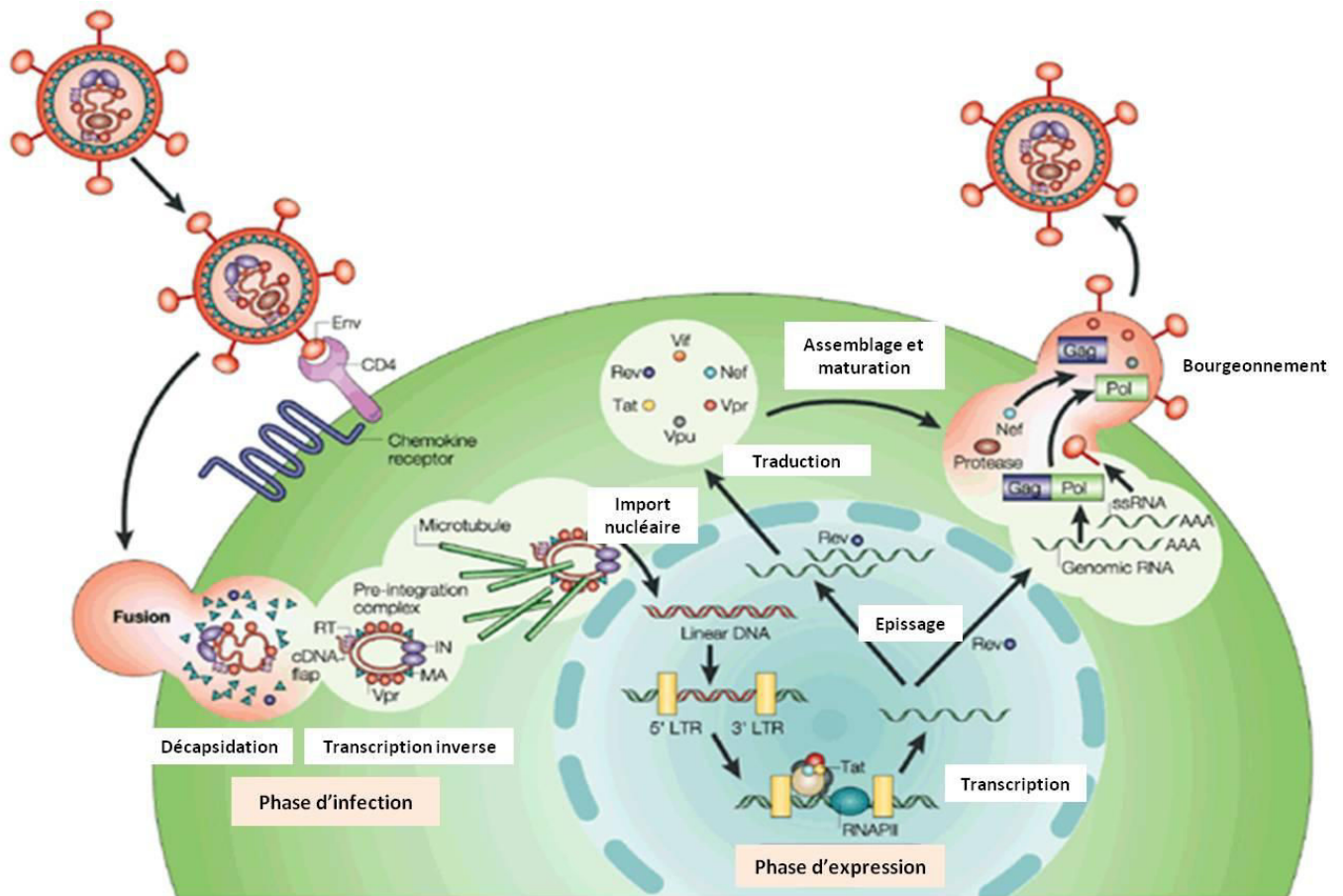
C'est par la composition en protéines auxiliaires que l'on peut discriminer les génomes du VIH-1 et du VIH-2. Les 2 souches possèdent les protéines Vif (*virion infectivity factor*), Vpr (*viral protein R*) et Nef (*negative regulatory factor*) mais une protéine auxiliaire est spécifique à chaque lignée virale. La protéine Vpu (*viral protein unique*) pour le VIH-1 et la protéine Vpx (*viral protein X*) pour le VIH-2 (Figure 4 haut). Toutes les protéines sont assemblées à la membrane plasmique de la cellule, pour former de nouvelles particules virales (Figure 4 bas), permettant la propagation virale.

1.1.5 – Le cycle de réplication virale

Le VIH pénètre l'organisme de l'hôte sain après un contact avec des fluides biologiques infectés et la transmission du virus se fait via l'infection de nouvelles cellules. Le virus a la possibilité de se multiplier car il possède un tropisme pour des cellules de l'immunité, les lymphocytes T, les macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules sont présentes dans les organes lymphoïdes et la circulation sanguine à la périphérie des tissus premièrement infectés. Par conséquent, lors de la primo infection, le système immunitaire est présent au site d'infection et des signaux chimiques via des cytokines entraîne le recrutement et la prolifération des cellules cibles de l'infection. C'est par ce détournement du système immunitaire que le VIH se multiplie de manière exponentielle très rapidement après l'infection. L'omniprésence et la circulation dans tout l'organisme des cellules du système immunitaire entraînent une dissémination rapide des cellules infectées, permettant au virus de se répliquer et de créer des réservoirs favorisant sa survie à long terme au sein de l'hôte.

1.1.5.1– Les étapes précoces du cycle de réplication virale

Le cycle de réplication virale comporte une série d'événements biologiques qui peuvent se séparer en deux parties distinctes, les étapes précoces et les étapes tardives de la multiplication virale.



Nature Reviews | Immunology

Figure 5 : Cycle de réplication du VIH au sein des cellules de l'immunité. Adaptée de (Peterlin and Trono, 2003). Les protéines d'enveloppe du VIH reconnaissent à la surface des cellules cibles des récepteurs qui permettent la reconnaissance, la liaison et la fusion des virus à l'intérieur des cellules. La capside est déstabilisée pour permettre l'étape de transcription inverse, qui synthétise à partir de la matrice ARN, un ADN double brin. Cet ADN est pris en charge par le complexe de pré-intégration (PIC) afin d'être transporté au noyau et intégré au génome cellulaire. La transcription permet la synthèse des messagers viraux qui sont transportés dans le cytoplasme et traduits au niveau du réticulum endoplasmique pour former tous les composants viraux. Ces protéines sont ensuite transportées jusqu'à la membrane plasmique pour être assemblées sous formes de nouvelles particules virales contenant l'ARN viral. Les particules bourgeonnent, sont libérées dans le milieu extracellulaire et sont maturées pour former de nouveaux virus capables d'infecter d'autres cellules.

Les étapes précoces du cycle de réplication virale débutent lors de la reconnaissance et la liaison des récepteurs cellulaires jusqu'à l'intégration du génome viral, provirus, au sein du génome cellulaire (Figure 5).

Tout d'abord, la liaison du virus à la cellule est possible grâce à l'identification, par les protéines d'enveloppe du virus, de la protéine CD4 (cluster de différenciation 4). Elle est présente à la surface des lymphocytes T, des monocytes et macrophages ainsi qu'à la surface de certaines cellules dendritiques. Le CD4 est un corécepteur qui favorise l'interaction entre le récepteur des cellules T et des molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Le tropisme et la spécificité des cellules reconnues par le VIH se font également par l'intermédiaire des corécepteurs CCR5 (CC-chemokine receptor 5) et CXCR4 (gène *CXCR4* codant pour le récepteur membranaire de SDF-1) (Wyatt and Sodroski, 1998). Au niveau de l'enveloppe virale, les protéines responsables de l'interaction avec les récepteurs cellulaires sont les protéines gp120 et gp41. Ces protéines sont issues du clivage de la polyprotéine gp160 codée par *env*. Il a été décrit que la protéine gp120 est responsable de la liaison aux récepteurs CD4, ce qui entraîne un changement de conformation permettant la liaison au corécepteur (Lapham et al., 1996; Trkola et al., 1996; Wu et al., 1996) transmettant alors à la protéine gp41 des signaux induisant la fusion des membranes cellulaires et virales (Melikyan et al., 2000).

Une fois la fusion réalisée, deux modèles s'opposent quant à la suite de la réplication virale. Un premier modèle démontre que la capsid virale est internalisée dans la cellule et partiellement dissociée au contact de la membrane plasmique, permettant la formation du complexe de transcription inverse. Un second modèle montre que la capsid reste intacte pendant un certain temps afin que l'initiation de la transcription inverse se fasse et que la décapsidation a lieu graduellement lors du transport jusqu'au noyau, via le cytosquelette.

L'étape suivante est la transcription inverse, qui permet la synthèse d'un ADN double brin à partir d'un ARN de polarité positive présent dans la capsid. Cette étape est réalisée par une protéine virale mais nécessite des composants cellulaires tels que les nucléotides.

Une fois la transcription inverse effectuée, le génome viral à ADN double brin est transporté jusqu'au noyau grâce au PIC (Bowerman et al., 1989). Contrairement à d'autres rétrovirus, comme HTLV (Human T-cell leukemia/lymphoma virus) par exemple, le VIH n'a pas besoin que la membrane nucléaire soit complètement désintégrée lors de la division cellulaire pour entrer dans le noyau. En effet, plusieurs membres du PIC possèdent des signaux de localisation nucléaire (NLS), comme la matrice (MA) et Vpr. Le virus peut alors traverser la membrane par l'interaction de ces protéines avec des pores nucléaires (Depienne et al., 2001; Gallay et al., 1997). Ce franchissement est favorisé

également par l'intégrase grâce à son interaction avec LEDGF/p75 (Lens epithelium-derived growth factor). L'ADN double brin linéaire une fois dans le noyau est encadré à ses extrémités LTR par l'intégrase et par des protéines de la voie SWI/SNF (Switch/Sucrose Non-Fermentable), nécessaires aux remodelages de la chromatine favorisant un environnement propice à l'intégration. Le VIH n'a pas de sites spécifiques d'intégration au sein du génome de l'hôte mais s'intègre en général dans des régions transcriptionnellement actives ou centromériques, riches en hétérochromatines (Mitchell et al., 2004; Schröder et al., 2002).

Une fois l'ADN viral intégré, la transcription se fait par l'action mutuelle de la machinerie transcriptionnelle de la cellule et de la protéine virale Tat. L'enzyme impliquée dans la création des transcrits viraux est l'ARN polymérase II (Pol II) qui est aussi majoritairement responsable de la synthèse des messagers, des petits ARN nucléaires ainsi que des micros ARN dans la cellule. La transcription est l'étape centrale du cycle de réplication virale à la frontière entre les étapes précoces et tardives (Figure 5).

1.1.5.2 – Les étapes tardives du cycle de réplication virale

Après l'étape de transcription, le génome viral se présente sous la forme d'un ARN de longue taille dont seront issus, toutes les protéines grâce à de multiples sites d'épissage, en particulier les précurseurs Gag et Gag-Pol. L'ARN de longue taille sert également de matrice, qui pourra être encapsidée dans les nouvelles particules virales. Des ARN partiellement épissés permettront la synthèse des protéines Env, Vif, Vpr et Vpu alors que des petits ARN généreront les protéines Tat, Rev et Nef. La protéine virale Rev joue un rôle dans le transport et la stabilité des messagers viraux non épissés, majoritaires, via son interaction avec une séquence de réponse à Rev (RRE) située au niveau de *env* (Malim et al., 1989).

Une fois que toutes les protéines virales et que les ARN qui serviront de matrices ont été produits, l'assemblage des nouvelles particules virales a lieu à la membrane plasmique de la cellule infectée. L'acteur majeur de l'assemblage est la protéine Gag car elle permet d'induire la formation de particules virales (Muriaux et al., 2001). Le précurseur Gag est capable d'interagir avec les protéines d'enveloppe présentes à la membrane plasmique mais aussi avec les matrices ARN constituant les nouveaux génomes viraux. Une fois tous les constituants rassemblés à la membrane plasmique, dans des régions de la membrane riche en cholestérol, le bourgeonnement a lieu. Ce n'est pas un événement spontané mais induit par le virus et notamment par Gag grâce à sa capacité à interagir avec les membranes et à polymériser. Des protéines cellulaires appelées ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport), qui sont impliquées dans le remodellement des membranes

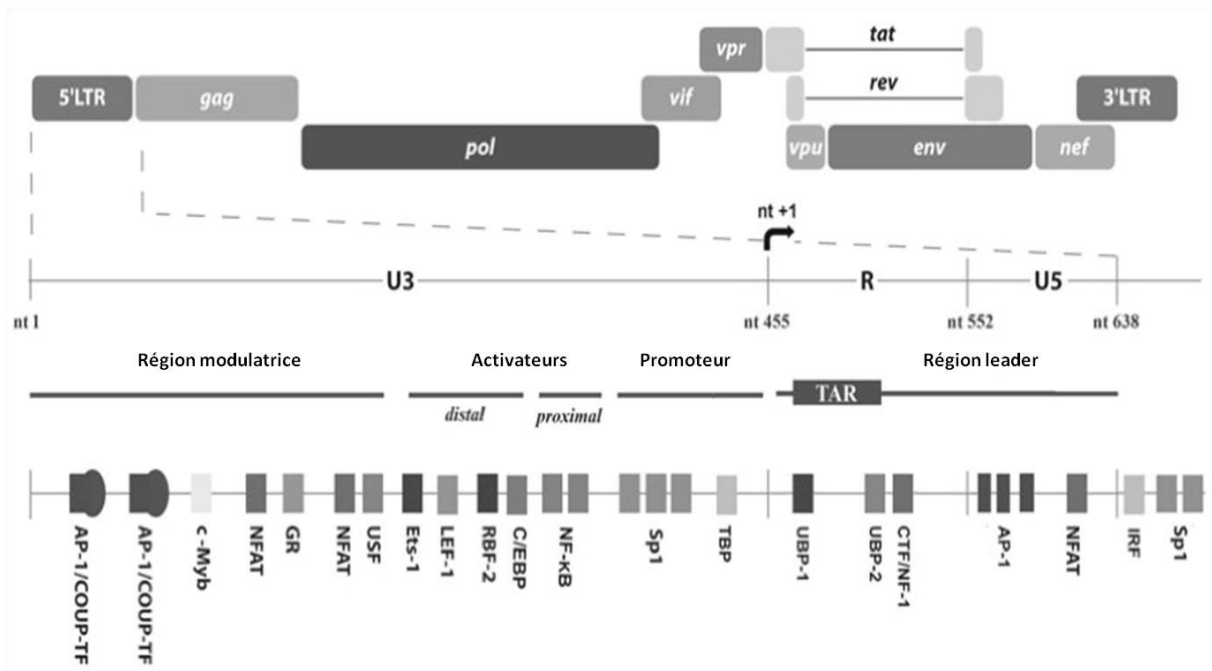


Figure 6 : Représentation schématique du LTR 5' du VIH. Adaptée de (Colin et al., 2014). *Le promoteur du VIH contient différentes régions ayant toutes un rôle précis lors de la réplication du virus. Une région U3 contenant les éléments régulateurs, les sites nécessaires à l'initiation de la transcription où se fixe des facteurs cellulaires et enfin le site d'initiation de la transcription. Plus précisément, la région modulatrice contient des éléments de réponse aux gluco et minéralocorticoïdes identifiés par GR (glucocorticoïde receptor). Les deux autres régions du LTR, R et U5, contiennent la séquence TAR, la région leader et d'autres sites de reconnaissance pour des éléments régulateurs.*

cellulaires, participent à l'assemblage et au bourgeonnement des particules virales. Une fois les particules libérées, la protéase virale clive le précurseur Gag ou Gag-Pol selon des sites spécifiques sur la séquence afin de former des virions matures (Pettit et al., 1994) qui arborent une capsidie bien définie.

1.2 – Transcription du VIH et rôle de la protéine Tat

La transcription est un élément essentiel du cycle de réplication du virus. Cette étape est étroitement régulée par ce dernier qui détourne des éléments cellulaires grâce une protéine virale codée par son génome, la protéine Tat. L'action de cette protéine virale permet au virus d'accomplir une transcription complète (Arya et al., 1985; Sodroski et al., 1985a). La transcription du génome viral est généralement décrite comme se déroulant en deux étapes.

La première étape est dépendante de facteurs cellulaires capables d'interagir avec des sites présents sur le LTR et régulant la transcription en *cis*. Cela permet de produire des transcrits incomplets, mais suffisant pour initier la synthèse de la protéine Tat.

La seconde est dépendante de la protéine Tat qui, une fois synthétisée, peut transactiver l'expression du génome viral à partir du promoteur LTR (Sodroski et al., 1985b), grâce à différents facteurs transcriptionnels. La transcription est plus efficace après la liaison de Tat à une région appelée TAR (Trans activation response element) (Rosen et al., 1985). TAR est un petit ARN précoce, en structure tige boucle, permettant de lier Tat afin de favoriser l'élongation de la transcription.

Les LTR présents aux extrémités 5' et 3' sont des séquences non codantes de compositions identiques et caractéristiques des rétrovirus. Ils sont organisés en 3 régions distinctes, la région U3 (unique 3'), la région R (répétée) et la région U5 (unique 5') (Figure 6). La partie U3 du LTR, modulatrice de la transcription, est définie comme contenant des sites de liaisons à des acteurs indispensables à la régulation de la transcription. Ce sont des facteurs négatif et positif de natures variables, qui se lient au promoteur en fonction du type cellulaire et du statut de division de la cellule. Parmi les différents sites présents dans la région modulatrice, on retrouve notamment des éléments de réponse aux stéroïdes. La région U3 contient aussi des sites de liaison pour des facteurs de transcriptions cellulaires tels que Sp1 (specificity protein 1) sur la partie promotrice du LTR. On retrouve des éléments NF- κ B (nuclear factor-kappa B), indispensable à la régulation positive de la transcription virale (Berkhout et al., 1990) ainsi que p300/CBP (CREB (cAMP-response element-binding protein) binding protein). Les sites Sp1 et NF- κ B agissent de concert pour activer de manière synergique la transcription virale en réponse à des stimuli cellulaires.

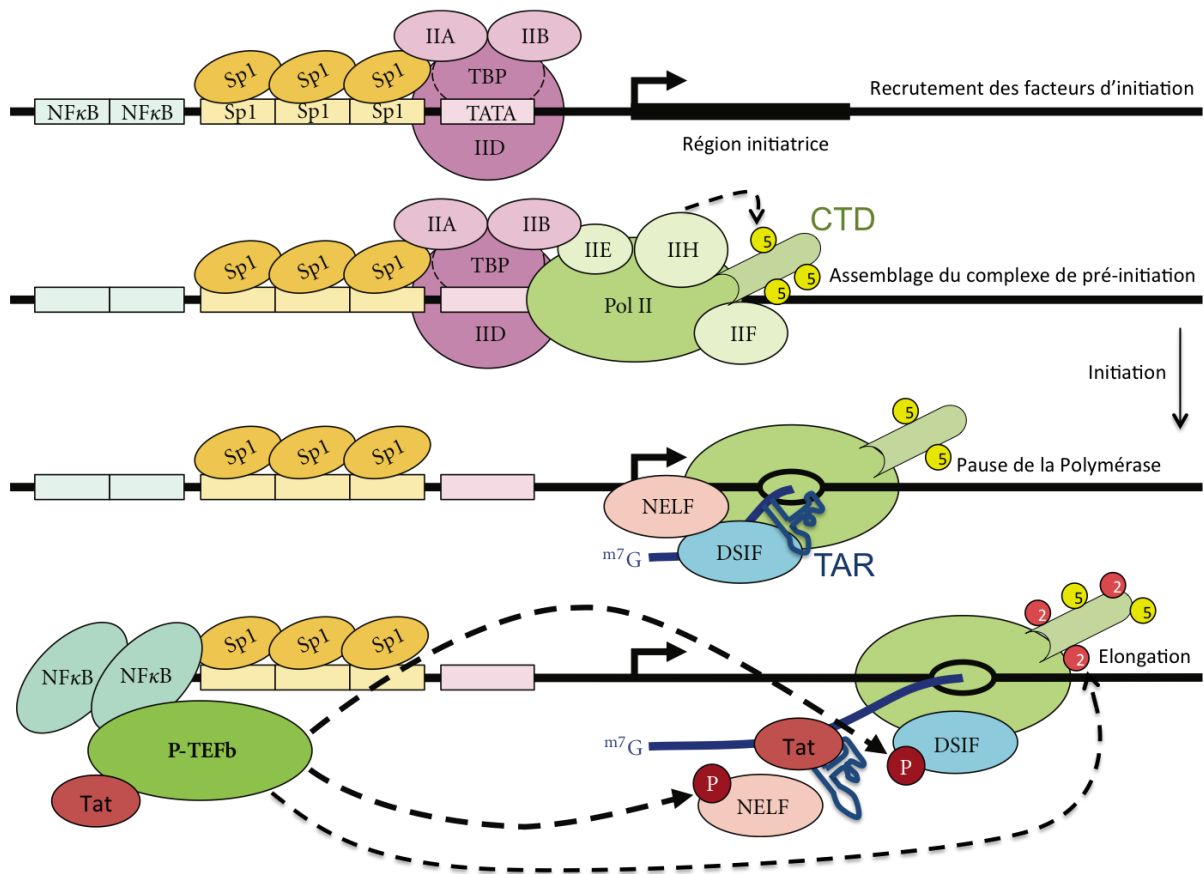


Figure 7 : Représentation schématique de la transcription du VIH. Adaptée de (Nilson and Price, 2011). Les facteurs généraux de transcription sont recrutés au niveau de la boîte TATA grâce à des activateurs de type Sp1. Ensuite, la Pol II est recrutée avec les différents facteurs nécessaires à sa régulation et notamment TFIIH qui phosphoryle le CTD en position 5. Cette phosphorylation initie la transcription qui est interrompue peu de nucléotides plus tard, c'est la pause, à cause du recrutement des facteurs négatifs d'élongation. Pendant cette progression de la Pol II, la séquence TAR est synthétisée. Le complexe P-TEFb va être capable de phosphoryler les facteurs négatifs d'élongation afin de libérer la polymérase et l'ARN viral, dont l'élongation est permise par la phosphorylation du CTD de la Pol II en position 2 ce qui réenclenche la transcription.

Cette région U3 contient également la boîte TATA, site de liaison des différents éléments cellulaires de la transcription tel que TBP (TATA binding proteins). La deuxième région importante du LTR est composée de R et de U5. Cette région contient divers motifs cruciaux pour la régulation de la transcription virale et la région TAR pour l'élongation. La majeure partie des sites de fixation de facteurs de transcription sur les régions du LTR 5' ne permettent pas, de manière individuelle, une transcription complète du virus. Cependant, ils peuvent recruter un ensemble de protéines cellulaires régulant positivement ou négativement la transcription virale.

1.2.1 – Initiation de la transcription virale

Chez les eucaryotes, la transcription est gouvernée par la liaison de facteurs de transcription qui s'assemblent sur des séquences promotrices et activatrices directement sur l'ADN génomique. Concernant le virus, l'initiation de la transcription se fait à partir du promoteur LTR 5' du génome viral et plus particulièrement dans la région U3 qui contient les sites nécessaires à la fixation des facteurs généraux de transcription (GTF) (Figure 7). La reconnaissance de motifs sur l'ADN proviral par des activateurs comme Sp1 et NF- κ B peut permettre le recrutement de cofacteurs et GTFs nécessaires pour l'initiation de la transcription. Ces facteurs incluent l'ARN Polymérase II et au moins six GTFs pour une transcription complète. Les complexes TFIID (transcription factor II D), TFIIA (transcription factor II A), TFIIB (transcription factor II B), TFIIIE (transcription factor II E), TFIIF (transcription factor II F) et TFIIH (transcription factor II H). Ces facteurs sont assemblés dans un ordre précis pour former le complexe de pré-initiation, qui se forme au niveau de la boîte TATA sur le LTR. Dans un premier temps, pour la formation du complexe, TFIID vient se lier sur les éléments TBP avec un ensemble de facteurs nommés facteurs associés à TBP (TAF). Ensuite les éléments TFIIA, TFIIB stabilisent la liaison entre TFIID et le promoteur, et la Pol II associée à TFIIF se lie à TFIID. Dans un dernier temps TFIIIE et TFIIH viennent compléter la formation d'un volumineux complexe de pré-initiation (Figure 7).

Il a été décrit que Tat était capable d'activer l'initiation de la transcription (Laspiá et al., 1989) ainsi que d'interagir avec différents éléments composants le complexe de pré-initiation tel que TBP et TFIIH (García-Martínez et al., 1997).

Récemment, il a été mis en évidence que le complexe Sp1/médiateur favorise la réplication virale (Brass et al., 2008; Zhou et al., 2008a). Il est constitué de 26 sous-unités chez les mammifères et permet d'activer des facteurs de transcription directement liés à la Pol II en formant un pont moléculaire entre les domaines d'activation et la polymérase. A ce stade, la Pol II n'est pas phosphorylée au niveau de son domaine C-terminal (CTD). La phosphorylation du CTD de la Pol II se

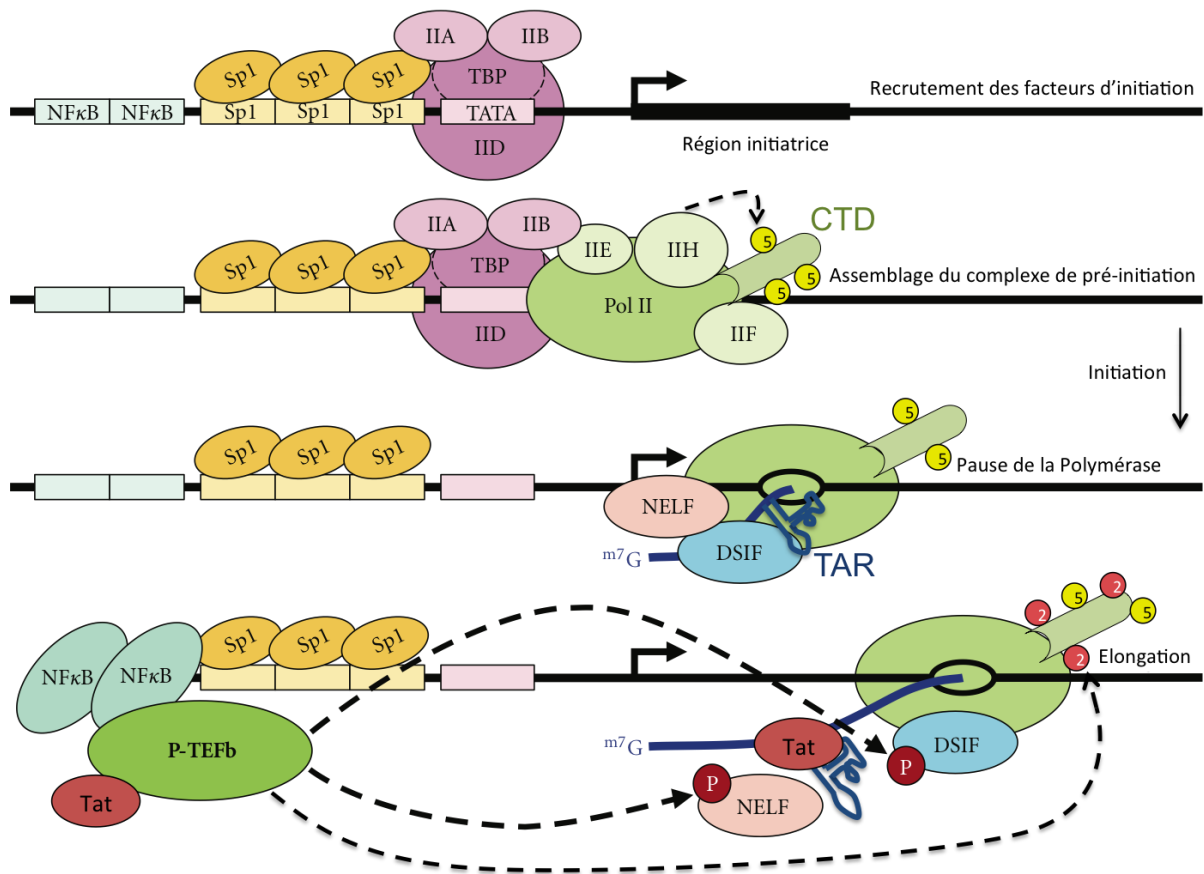


Figure 7 : Représentation schématique de la transcription du VIH. Adaptée de (Nilson and Price, 2011). Les facteurs généraux de transcription sont recrutés au niveau de la boîte TATA grâce à des activateurs de type Sp1. Ensuite, la Pol II est recrutée avec les différents facteurs nécessaires à sa régulation et notamment TFIIF qui phosphoryle le CTD en position 5. Cette phosphorylation initie la transcription qui est interrompue peu de nucléotides plus tard, c'est la pause, à cause du recrutement des facteurs négatifs d'élongation. Pendant cette progression de la Pol II, la séquence TAR est synthétisée. Le complexe P-TEFb va être capable de phosphoryler les facteurs négatifs d'élongation afin de libérer la polymérase et l'ARN viral, dont l'élongation est permise par la phosphorylation du CTD de la Pol II en position 2 ce qui réenclenche la transcription.

situé au niveau de résidus sérines présents parmi un motif répété **YSPTSPS** (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser). Une kinase phosphoryle la sérine en position 5 du motif répété, ce qui permet d'initier la transcription du provirus. Cette phosphorylation est effectuée par une sous-unité du complexe TFIIH, CDK7 (cyclin-dependent kinase 7). Bien que l'initiation de la transcription soit dépendante de la phosphorylation du CTD par CDK7 en présence de Tat (Cujec et al., 1997), il a été décrit *in vitro* que le CTD peut être phosphorylé en absence de la protéine Tat laissant supposer que d'autres enzymes puissent être impliquées dans ce processus (Keen et al., 1996). L'initiation de la transcription est également soumise à d'autres activités du complexe TFIIH. En effet, ses activités hélicase et ATPase sont requises afin d'ouvrir et de dérouler l'ADN.

Le rôle exact de Tat dans l'initiation fait débat car il a été démontré que l'étape limitante de la transcription dépendante de Tat est l'élongation ; du fait de l'interaction de Tat avec le complexe P-TEFb (positive transcription elongation factor) (Flores et al., 1999). P-TEF-b est un complexe de 2 sous-unités, CDK9 (cyclin-dependant kinase 9) et cycline T1, dont le rôle est d'activer l'élongation des transcrits. Diverses études *in vitro* ont montrées que la déplétion de P-TEFb, l'utilisation d'anticorps anti-CDK9 ou l'expression d'un mutant catalytiquement inactif de CDK9 inhibaient la transcription dépendante de Tat (Mancebo et al., 1997; Zhu et al., 1997). Par ailleurs, il a été décrit que P-TEFb peut être présent au niveau du complexe de pré-initiation (Ping and Rana, 1999).

1.2.2 – Echappement du promoteur et pause transcriptionnelle

Une fois la transcription initiée, la Pol II progresse à partir du site d'initiation de la transcription +1 et synthétise un petit ARN d'environ 50 nucléotides avant de marquer une pause (Figure 7). Cette première synthèse permet d'obtenir un ARN exposant la structure TAR. Cette pause de la transcription est une autre étape de régulation qui permet de fixer la coiffe sur les transcrits synthétisés et constitue l'étape d'échappement du promoteur. Tout au long de cette progression vers la pause de la transcription, la Pol II va perdre un à un tous les facteurs de transcription recrutés sur la région promotrice. Dans cette même période, la Pol II va recruter le complexe DRB (5,6-dichloro-1- β -d-ribofuranosylbenzimidazole) sensitivity inducing factor (DSIF) et negative elongation factor (NELF). DSIF est un hétérodimère composé de Spt4 et Spt5 tandis que NELF est un complexe composé de 4 sous unités A, B, C/D, E. Les facteurs DSIF (Wada et al., 1998) et NELF (Yamaguchi et al., 1999) sont responsables de l'inhibition de l'élongation de la transcription et par conséquent entraîne la synthèse de transcrits incomplets en absence de facteur d'élongation positif.

P-TEFb est important dans la régulation de l'élongation et notamment pour la transcription dépendante de la protéine Tat. Dans la cellule, la majorité de P-TEFb est séquestrée dans un complexe composé de la protéine HEXIM et de l'ARN 7SK. La liaison de P-TEFb à la ribonucléoparticule nucléaire 7SK et la liaison de la cycline T1 à HEXIM inhibe l'activité catalytique de P-TEFb nécessaire à l'élongation de la transcription. Cependant, P-TEFb a besoin d'être libéré du complexe HEXIM/7SK afin de phosphoryler NELF et DSIF pour permettre une élongation productive.

1.2.3 – Elongation de la transcription virale

En présence de Tat, P-TEFb est libéré du complexe HEXIM/7SK car Tat possède une plus grande affinité que la protéine HEXIM pour la cycline T1 et donc détourne le complexe afin de se lier à la structure TAR synthétisée avant la pause de la Pol II. Au niveau de l'ARN TAR, on retrouve un complexe Tat/P-TEFb/TAR qui permet à P-TEFb d'exercer son activité de kinase sur NELF et DSIF les rendant inactifs. Plus précisément, la kinase CDK9 phosphoryle NELF ce qui dissocie la liaison entre le complexe et l'ARN Pol II alors que la phosphorylation de la sous-unité Spt5 de DSIF change le complexe en facteur d'élongation positif. Une fois l'activité répressive de ces facteurs abolie, la sous-unité CDK9 est capable de phosphoryler les résidus sérine en position 2 sur le CTD de la Pol II. Cette hyper phosphorylation du CTD permet une élongation productive (Marshall et al., 1996) et la synthèse des ARN viraux.

Une hypothèse supportant le fait que l'élongation est la partie limitante de la transcription virale est que P-TEFb est un complexe indispensable à la production des transcrits viraux. En effet, la position des sérines phosphorylées par CDK9 dépendrait de la présence ou non de Tat car il existe des évidences que CDK9 pourrait, en l'absence de CDK7, être responsable de la phosphorylation de la sérine 2 mais aussi de la sérine 5. Tat entraînerait une modification de la spécificité du substrat de P-TEFb (Zhou et al., 2000) ce qui serait favorable, en absence de TFIIH, à la formation du complexe de pré-initiation. En parallèle, TFIIH a été décrit comme responsable de l'inhibition de la phosphorylation de CDK9 (Zhou et al., 2001). P-TEFb est recruté de manière précoce et le complexe TFIIH empêche son activation jusqu'à ce qu'il soit relâché, lors de la progression de la Pol II.

La protéine Tat est capable d'interagir avec les principaux complexes de régulation de la transcription cellulaire et les détourne au profit du virus afin de permettre l'expression complète des gènes viraux. Une autre facette de la régulation de la transcription par Tat est son interaction avec des histones acétyl transférase (HAT) qui sont des cofacteurs transcriptionnels. Le transfert de résidus acétyls sur les histones favorise l'accessibilité de la chromatine et l'activation transcriptionnelle du LTR du

Mécanismes de la latence du VIH

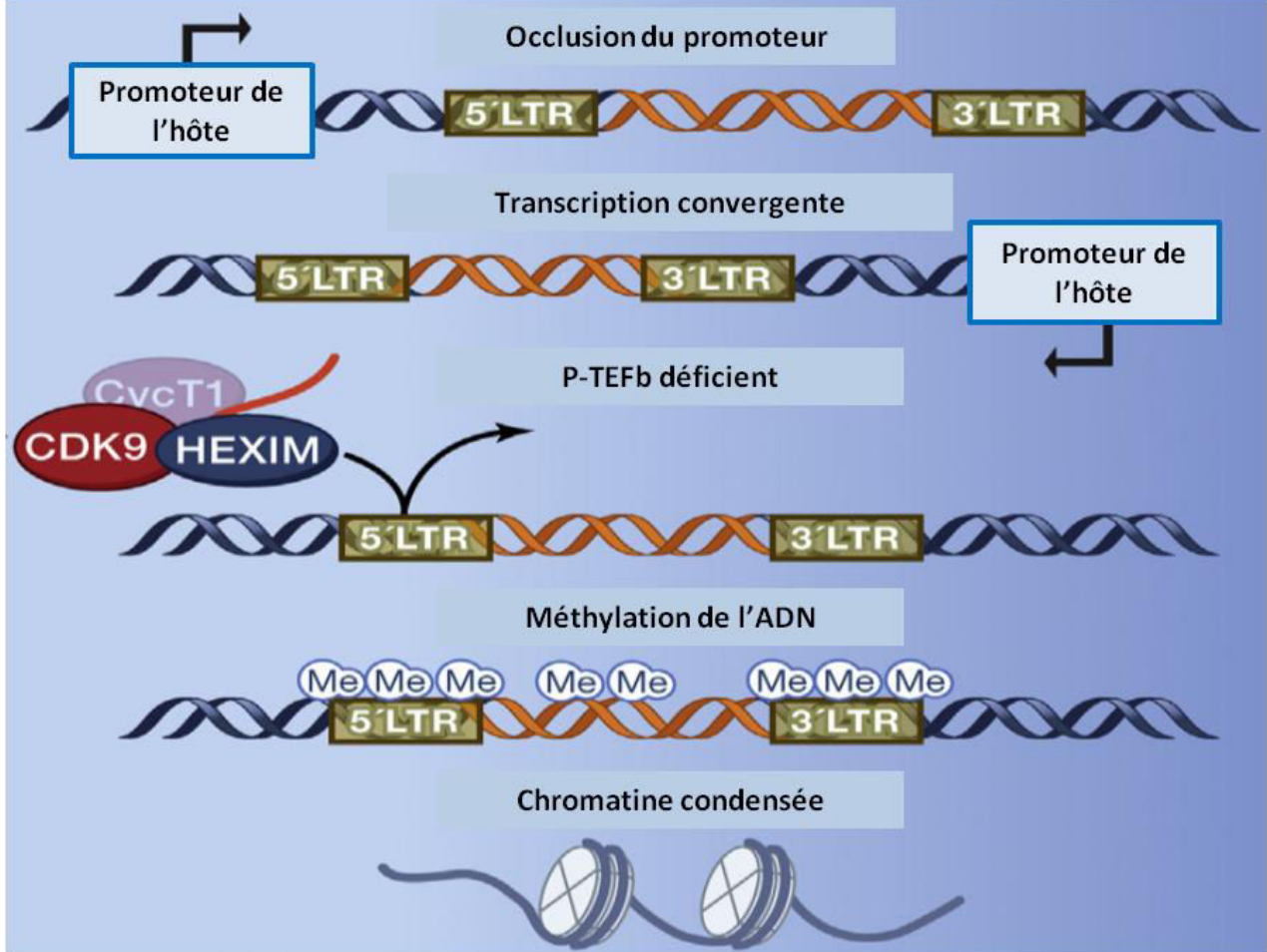


Figure 8 : Les mécanismes potentiels conduisant à l'établissement de la latence du VIH. Adaptée de (Ruelas and Greene, 2013). Il existe différents modèles permettant d'expliquer la latence du VIH au sein des cellules. Ces différentes hypothèses regroupent des mécanismes d'inhibition de la transcription du promoteur viral LTR, des mécanismes conduisant à une déficience de l'élongation ce qui entraîne la synthèse de transcrits de petite taille insuffisant pour permettre la réplication du génome viral entier et donc une infection productive. Mais encore des modifications au niveau de la structure du génome empêchant l'accès aux facteurs de transcription.

VIH. Il a également été décrit que la protéine Tat pouvait être acétylée sur 3 lysines modulant son interaction avec P-TEFb et augmentant l'affinité pour la formation du complexe Tat/P-TEFb/TAR (Kiernan et al., 1999) et par conséquent favorisant l'élongation de la transcription des transcrits du virus.

1.2.4 – Latence virale

La latence virale fait référence à des événements d'intégration stables, consistant en l'insertion du provirus, dans des régions du génome cellulaire défavorables à son expression. La latence virale est un événement rare qui apparaît, à une fréquence de 1 pour 1.10^7 cellules infectées (Redel et al., 2010), de manière très précoce limitant ainsi l'efficacité des traitements antirétroviraux. Il est également connu que des facteurs cellulaires sont responsables de l'inhibition de l'expression du génome rendant le provirus latent. Ces intégrations stables et ces mécanismes cellulaires sont impliqués dans la création de réservoirs viraux. Il a été identifié au début des années 90 que des cellules étaient infectées de manière latente (McElrath et al., 1991). Les principales cellules servant de réservoirs au VIH sont les cellules qui ne se divisent pas ou peu tels que les lymphocytes T CD4 + quiescents et mémoires (Chun et al., 1998). Il existe aujourd'hui des évidences soulignant que d'autres cellules, peuvent constituer des réservoirs, comme les monocytes et les cellules dendritiques (Keele et al., 2008; Zhu et al., 2002). Ces cellules vont alors constituer les réservoirs viraux au sein de l'hôte infecté.

Différentes études ont montré que l'établissement de la latence du VIH pouvait être la conséquence de différents événements cellulaires (Figure 8).

Le premier mécanisme concerne une anomalie de la transcription. En effet, l'expression d'un promoteur cellulaire proche du site d'intégration du virus peut empêcher le recrutement des facteurs de transcription nécessaires à l'expression du génome viral. Le génome viral peut également être inséré en anti-sens par rapport à la transcription du génome cellulaire, conduisant à la collision de l'ARN Pol II synthétisant le génome cellulaire et celle responsable de la transcription virale. Dans ces conditions, les 2 transcriptions peuvent être interrompues ou uniquement celle provenant du promoteur le plus faible (Lewinski et al., 2005). Enfin, il peut y avoir une anomalie lors de l'élongation de la transcription, étape limitante de la réplication virale, causée par un défaut au niveau de P-TEFb empêchant la synthèse de transcrits entiers. Les autres mécanismes pouvant expliquer le phénomène de latence sont représentés par des modifications au niveau du génome cellulaire. Cela

peut concerner une zone d'intégration virale où la chromatine est extrêmement condensée. La conséquence de cette compaction rigide de la chromatine correspond à une transcription peu efficace, voir nulle. On peut également retrouver des modifications telles que les méthylations des histones, des marques répressives de transcription ; sur le promoteur viral empêchant le recrutement des éléments nécessaires à l'initiation de la transcription.

La latence peut s'établir car la cellule infectée est de type quiescente et donc certains facteurs de régulation de la transcription important sont absents. La transcription basale n'ayant pas lieu au niveau du provirus intégré, Tat n'est pas synthétisée, entraînant l'absence d'ARN viraux.

De manière plus précise dans les lymphocytes T CD4+, 2 types de latence ont été décrits. Le premier est observé dans les cellules T naïves contenant un ADN viral non intégré, ce mécanisme est appelé latence pré-intégrative (Zack et al., 1990). Plusieurs événements peuvent être à l'origine de ce type de latence, une faible activité de la transcriptase inverse, un faible taux de nucléotides dans la cellule mais aussi un défaut d'import nucléaire ou d'assemblage du complexe de pré-intégration. Il est possible que ce mécanisme de latence pré-intégrative ne s'applique pas aux macrophages (Kelly et al., 2008). Le second mécanisme de latence a été observé dans les lymphocytes CD4+ quiescents, caractérisé comme une latence post-intégration. Au sein de ces cellules, l'infection est fortement restreinte, suggérant que les CD4+ infectés étaient actifs avant de basculer vers un état quiescent. Les événements qui mènent à la latence, correspondent à ceux décrits dans la Figure 8 mais dépendent en premier lieu de l'environnement chromatinien. Cette latence peut faire suite à l'intégration et donc le génome ne sera jamais transcrit ou alors la latence est établie après plusieurs cycles de transcription du provirus. L'intégration préférentielle du virus au sein de zone transcriptionnellement active supporte le second mécanisme de latence (Han et al., 2004).

Ces mécanismes de nature variable permettent au virus de persister au sein de l'ADN de cellules ayant des conditions de réplication favorables à l'établissement de la latence, tous entraînant la survie du virus au sein de son hôte.

1.3 – Facteurs inhibiteurs et cofacteurs de la réplication virale

Le VIH comme l'ensemble des virus est un parasite obligatoire ne pouvant pas persister indéfiniment dans l'environnement sans infecter un hôte et s'y répliquer afin d'assurer sa multiplication. Le virus et l'Homme ont évolué concomitamment afin de trouver les meilleures conditions pour les deux parties dans un phénomène s'apparentant à une symbiose. Pour maintenir cet équilibre entre l'hôte et le virus, des facteurs cellulaires sont détournés par les protéines régulatrices du virus (Tat et Rev)

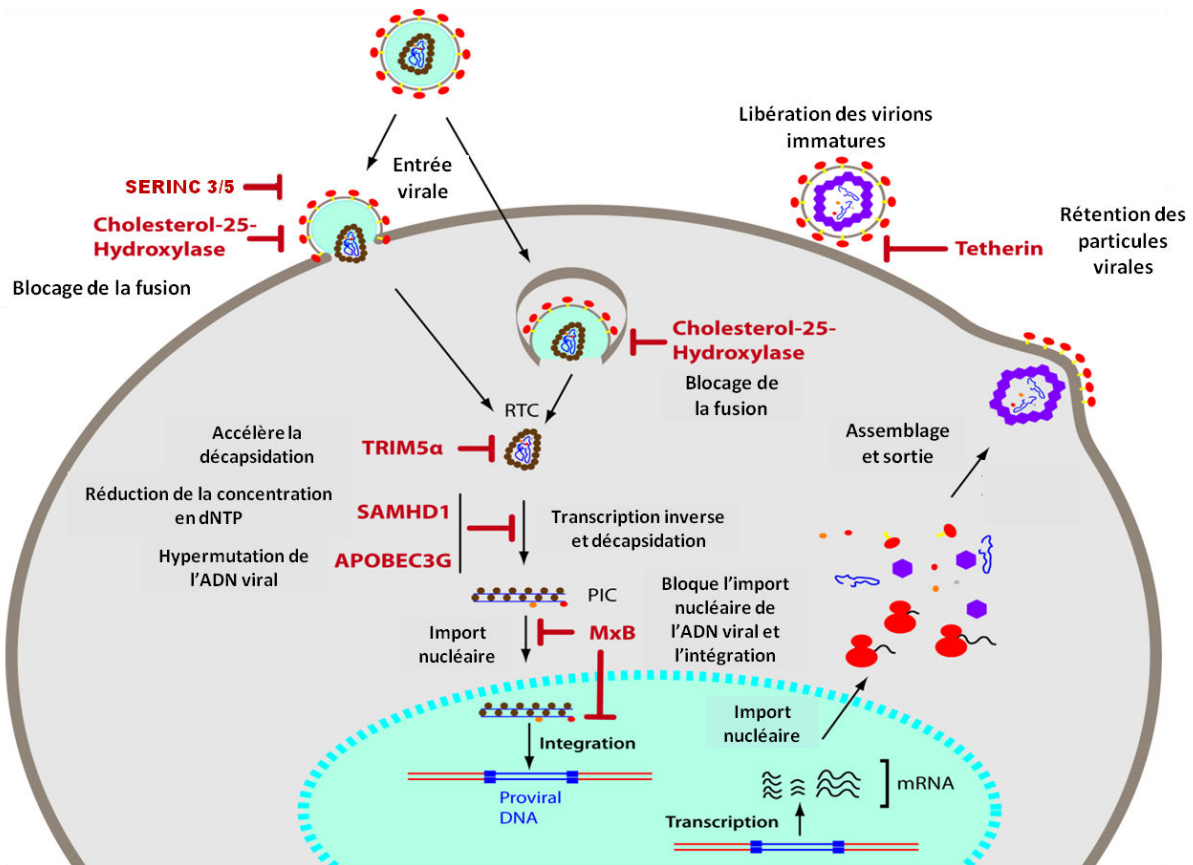


Figure 9 : Les principaux facteurs inhibiteurs du VIH et les étapes du cycle de réplication ciblées. Adaptée de (Azevedo-Pereira et al., 2015). Pour une inhibition efficace de la réplication virale, la cellule possède des protéines capables d'interférer avec différentes étapes du cycle de réplication du virus. CH25H et SERINC3/5 sont capables de limiter la fusion des particules virales avec la membrane plasmique. TRIM5 α , SAMHD1, APOBEC3G et MxB vont être responsables de l'inhibition d'étapes précoces du cycle, comme la décapsidation, la transcription inverse et l'import nucléaire. Enfin, tetherin/BST2 est capable d'inhiber le bourgeonnement des virus afin de diminuer la dissémination virale dans l'organisme.

et par les protéines auxiliaires, permettant une réplication virale optimale. Mais les protéines auxiliaires codées par le virus, Vif, Vpu, Vpx, Vpr et Nef, permettent de contrecarrer les activités antivirales de facteurs inhibiteurs intracellulaires.

1.3.1 – Les facteurs inhibiteurs de la multiplication du virus

Les facteurs inhibiteurs bloquent la réplication du virus, mais les facteurs intrinsèques les plus étudiés et les plus efficaces contre le VIH sont appelés facteurs de restriction. Ils sont décrits selon certains critères qui les différencient des autres protéines inhibitrices de l'infection (Malim and Bieniasz, 2012). Ces protéines fonctionnent de manière autonome vis-à-vis de la réplication virale, elles sont exprimées de manière constitutive dans certains types cellulaires et leur expression peut être induite par l'interféron (IFN). Elles possèdent des mécanismes d'inhibition virale spécifiques, des séquences en acides aminés variables étant donné leur coévolution avec les virus et enfin elles sont, pour la plupart, inhibées par des protéines auxiliaires du VIH. Actuellement on dénombre 4 facteurs de restriction, SAMHD1 (SAM domain and HD domain-containing protein 1) (Hrecka et al., 2011; Lahouassa et al., 2012), APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G) (Sheehy et al., 2002), tetherin/BST2 (bone marrow stromal antigen 2) (Neil et al., 2008; Van Damme et al., 2008) et TRIM5 α (Tripartite motif-containing protein 5) (Stremlau et al., 2004). Ces facteurs de restriction ont tendance à exercer leur activité en dehors de voies cellulaires alors que certains inhibiteurs agissent par l'intermédiaire de voies de signalisation.

1.3.1.1 – SAMHD1

SAMHD1 est un facteur de restriction dans les cellules myéloïdes de type macrophages et cellules dendritiques mais également dans les lymphocytes CD4+ quiescents (Baldauf et al., 2012; Descours et al., 2012; Laguette et al., 2011). A l'instar des autres facteurs de restriction qui ciblent directement des composés viraux, SAMHD1 a une activité antivirale indirecte en régulant la réserve de nucléotides au sein des cellules. En réduisant la concentration intracellulaire de nucléotides, SAMHD1 est responsable de l'inhibition de la transcription inverse. La protéine Vpx, contrecarre l'activité de SAMHD1 en interagissant avec l'adaptateur DCAF1 (DDB1-Cul4A-associated factor-1) permettant ainsi la formation du complexe E3-ubiquitine ligase composé de DCAF1, DDB1 (Damage-specific DNA binding protein 1), Cul4 (cullin 4), RBX (Ring box protein). Cette interaction entraîne la prise en charge de la protéine SAMHD1 par la machinerie ubiquitine protéasome ayant pour conséquence sa dégradation (Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011) (Figure 9).

1.3.1.2 – APOBEC3G

APOBEC3G possède une activité cytidine désaminase lui conférant sa capacité à inhiber le virus. L'activité antivirale est possible lorsque la protéine est incorporée dans la particule grâce à son interaction avec la nucléocapside et les ARN viraux. Comme pour SAMHD1, APOBEC3G est capable d'inhiber l'étape de transcription inverse lors de la synthèse de l'ADN. La protéine permet la désamination de la déoxycytidine en déoxyuracile au niveau de l'ARN du virus (Mangeat et al., 2003). Par conséquent, la protéine est responsable de l'apparition d'un grand nombre de mutations (G => A), pouvant atteindre jusqu'à 10% des cytidines de la matrice virale et conduisant à une réplication virale défectueuse. Il a été démontré que d'autres membres de la famille APOBEC3 sont capables d'inhiber la réplication virale. La protéine virale responsable de limiter l'action de la protéine APOBEC3G est Vif (Sheehy et al., 2002). De la même manière que Vpx contrecarre SAMHD1, la protéine Vif est capable de recruter un adaptateur CBF β (core binding factor b) entraînant l'association avec un complexe E3 ubiquitine ligase composé de Cul5 (cullin 5), RBX, ELOB (elongin B) et ELOC (elongin C). APOBEC3G est alors poly-ubiquitinylée et dégradée par le protéasome 26S.

1.3.1.3 – BST2/tetherin

Contrairement aux 2 facteurs précédents, tetherin/BST2 est présente au site de bourgeonnement du virus et maintient physiquement les particules virales néo formées à la surface des cellules. Une fois que les virions sont retenus à la membrane, l'hypothèse est qu'ils sont ré-internalisés grâce à des mécanismes d'endocytose pour être envoyés, par l'intermédiaire de compartiments endosomaux, vers leur dégradation (Neil et al., 2008; Van Damme et al., 2008). L'expression de BST2 dans les cellules est modulée par la présence de l'IFN. Afin de contourner l'activité antivirale de BST2/tetherin, le virus possède le gène codant la protéine Vpu. Cette protéine virale est capable de modifier la localisation intracellulaire de BST2. En effet, BST2 exerce un cycle régulier entre la membrane, le réseau trans-golgi et les endosomes, jusqu'à la voie de dégradation lysosomale. Vpu bloque le recyclage de BST2 des endosomes vers la membrane plasmique entraînant une forte diminution de la présence de la protéine à la membrane plasmique (Dubé et al., 2011).

1.3.1.4 – TRIM5 α

TRIM5 α cible une autre étape de la multiplication virale, la décapsidation, après la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane plasmique. TRIM5 α serait en effet capable de favoriser la

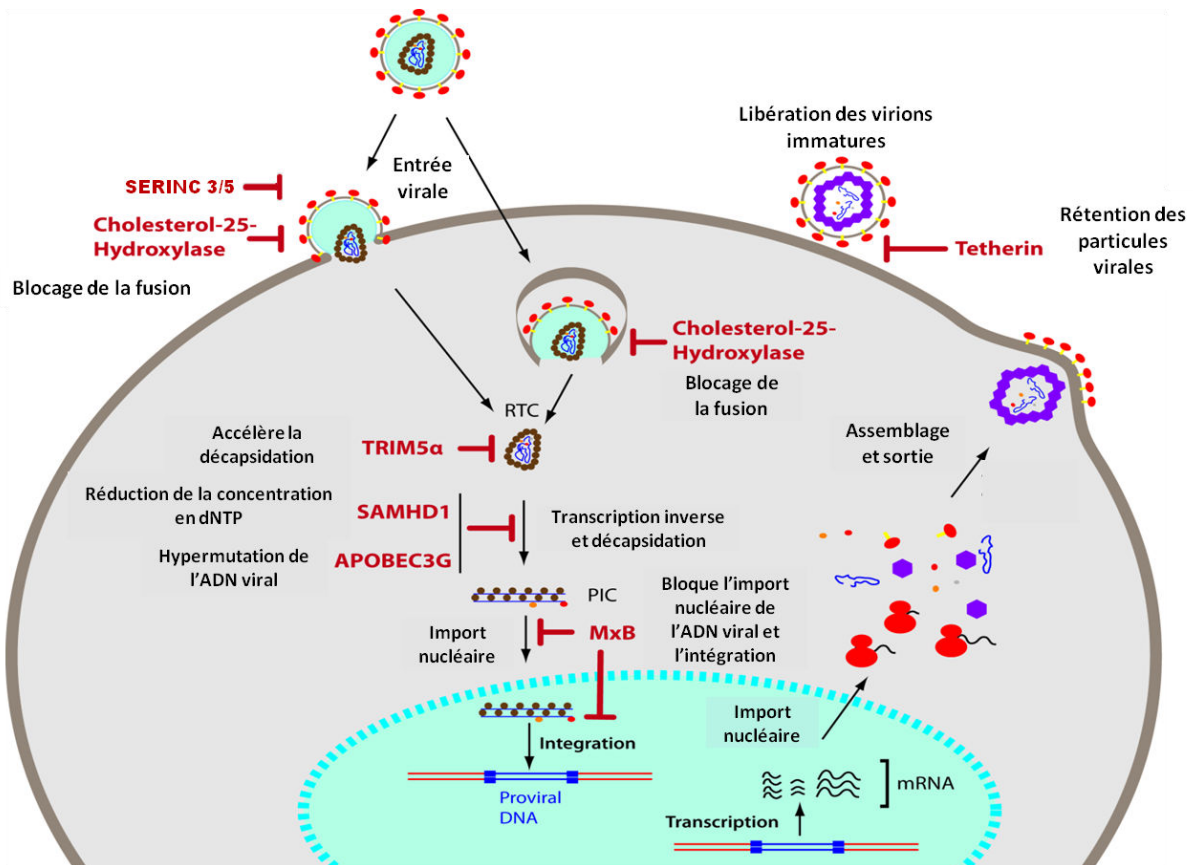


Figure 9 : Les principaux facteurs inhibiteurs du VIH et les étapes du cycle de réplication ciblées. Adaptée de (Azevedo-Pereira et al., 2015). Pour une inhibition efficace de la réplication virale, la cellule possède des protéines capables d'interférer avec différentes étapes du cycle de réplication du virus. CH25H et SERINC3/5 sont capables de limiter la fusion des particules virales avec la membrane plasmique. TRIM5 α , SAMHD1, APOBEC3G et MxB vont être responsables de l'inhibition d'étapes précoces du cycle, comme la décapsidation, la transcription inverse et l'import nucléaire. Enfin, tetherin/BST2 est capable d'inhiber le bourgeonnement des virus afin de diminuer la dissémination virale dans l'organisme.

déstabilisation/dégradation de la capsid de manière prématurée juste avant la transcription inverse en interagissant avec ces sous-unités (Stremlau et al., 2006). TRIM5 α est présent dans le cytoplasme de la majorité des cellules de primates et son oligomérisation est essentielle à son activité inhibitrice du virus. L'exception de TRIM5 α est qu'il n'est pas dégradé par une protéine auxiliaire du virus et le mécanisme exact par lequel il exerce son activité antivirale reste encore trouble. De la même manière que BST2, la protéine TRIM5 α peut être induite par l'INF.

En plus de ces facteurs de restriction contrecarrés par des protéines auxiliaires, d'autres protéines peuvent inhiber la multiplication (Figure 9).

1.3.1.5 – Les autres inhibiteurs du VIH

Il existe de nombreux facteurs cellulaires permettant l'inhibition du virus et il est probable que certaines protéines bloquant la réplication virale ne soient pas encore identifiées. Une protéine importante pour la régulation de l'infection virale est le récepteur CD4, car sa présence à la membrane des cellules peut entraîner un phénomène de surinfection. En effet, sa présence permet la liaison des particules virales aux cellules cibles mais entraînerait également la liaison immédiate des particules virales en bourgeonnement, bloquant ainsi la dissémination du virus (Bour et al., 1999). Pour cela, le virus exprime 2 protéines, Vpu et Nef, permettant de réguler négativement le trafic du récepteur CD4 résultant en une baisse d'expression de ce dernier à la membrane plasmique et aboutissant à sa dégradation.

L'infection virale induit la synthèse de l'INF et Schoggins et ses collaborateurs ont décrit que certaines protéines induites par l'INF sont capables d'inhiber la réplication de différents virus et notamment du VIH (Schoggins et al., 2011). Cette approche ainsi que d'autres études ont mis en évidence les protéines Mx (myxovirus resistance). Plus particulièrement, l'expression de la protéine MxB entraîne une inhibition de la multiplication virale. Des recherches ont montré que MxB était capable d'interagir avec la capsid virale et donc que son activité antivirale ciblait des événements après la libération de la capsid dans le cytoplasme (Goujon et al., 2013; Kane et al., 2013). Une autre protéine induite par l'INF est CH25H (cholestérol 25-hydroxylase). Cette protéine semble capable de bloquer la fusion entre la membrane plasmique et l'enveloppe (Liu et al., 2013) en modifiant la composition des lipides de la membrane ce qui a pour conséquence de modifier sa topologie et sa perméabilité.

Récemment, 2 nouvelles protéines, SERINC3 et 5 ont été décrites (Rosa et al., 2015; Usami et al., 2015). Ces protéines sont incorporées dans les particules virales et gênent la fusion de ces dernières avec la membrane cellulaire. Cependant, selon Rosa et ses collaborateurs, les effets de ces protéines

sur le VIH ne sembleraient pas se limiter à empêcher la fusion mais affecteraient probablement certaines étapes précoces. Ces protéines sont contrecarrées par Nef, ce qui réduirait leur expression à la surface des cellules.

Il existe de nombreuses protéines, induites par l'IFN ou non, qui sont capables d'inhiber la réplication virale dans certaines cellules. Cette inhibition n'est pas totale ni suffisante pour éliminer le virus de manière définitive et aucune protéine virale n'a été dédiée, lors de l'évolution concomitante du virus et de l'homme, à l'inhibition de leurs effets antiviraux. Malgré cela, leurs effets sont notables pour limiter la propagation virale dans l'organisme de l'hôte.

1.3.2 – Les facteurs facilitateurs ou cofacteurs du virus

Pour maintenir cet équilibre, la survie du virus dépend de l'action de cofacteurs de la réplication virale pour contre balancer les actions des facteurs inhibiteurs. Ces cofacteurs représentent aujourd'hui une nouvelle stratégie d'approche de synthèse de molécules antirétrovirales. Cibler des éléments viraux a entraîné l'émergence de variants résistants, favorisé par les mutations et l'adaptation virale.

Les principaux cofacteurs identifiés sont les protéines essentielles à l'accomplissement du cycle de réplication viral. En ce qui concerne l'entrée du virus, on retrouve les protéines CD4, CCR5 et CXCR4 citées précédemment. Elles sont indispensables à la reconnaissance, la liaison et la fusion des virus avec la membrane cellulaire. Pour atteindre le noyau, le virus se déplace grâce au cytosquelette et ses différents composants. A l'heure actuelle, aucun partenaire spécifique n'a été mis en évidence pour expliquer cette liaison et ce déplacement à travers le réseau cellulaire. Une fois le PIC dans le noyau, un autre facteur cellulaire LEDGF/p75 va permettre l'intégration de l'ADN viral au sein du génome de la cellule (Michel et al., 2009). Des études *in vitro* ont montré que non seulement LEDGF/p75 favorisait l'intégration dans des régions transcriptionnellement actives mais aussi augmentait l'affinité de l'intégrase pour l'ADN (McNeely et al., 2011). L'ADN intégré peut alors être transcrit par la machinerie cellulaire liée à la Pol II. Tous les facteurs généraux de transcription nécessaires à la synthèse des transcrits viraux peuvent être décrits comme des cofacteurs de l'infection virale. Deux complexes semblent jouer un rôle plus important, TFIIF qui fait partie du complexe de la Pol II et P-TEFb. Ils possèdent des enzymes indispensables à l'initiation et à l'élongation de la transcription. Une fois les transcrits synthétisés, ils sont transportés en dehors du noyau pour être traduits. Cette étape est favorisée par la protéine virale Rev qui est responsable de l'export des transcrits vers la machinerie de traduction. La protéine DDX3, hélicase de l'ARN dépendante de l'ATP, a été décrite comme nécessaire à l'activité de Rev pour le transport des

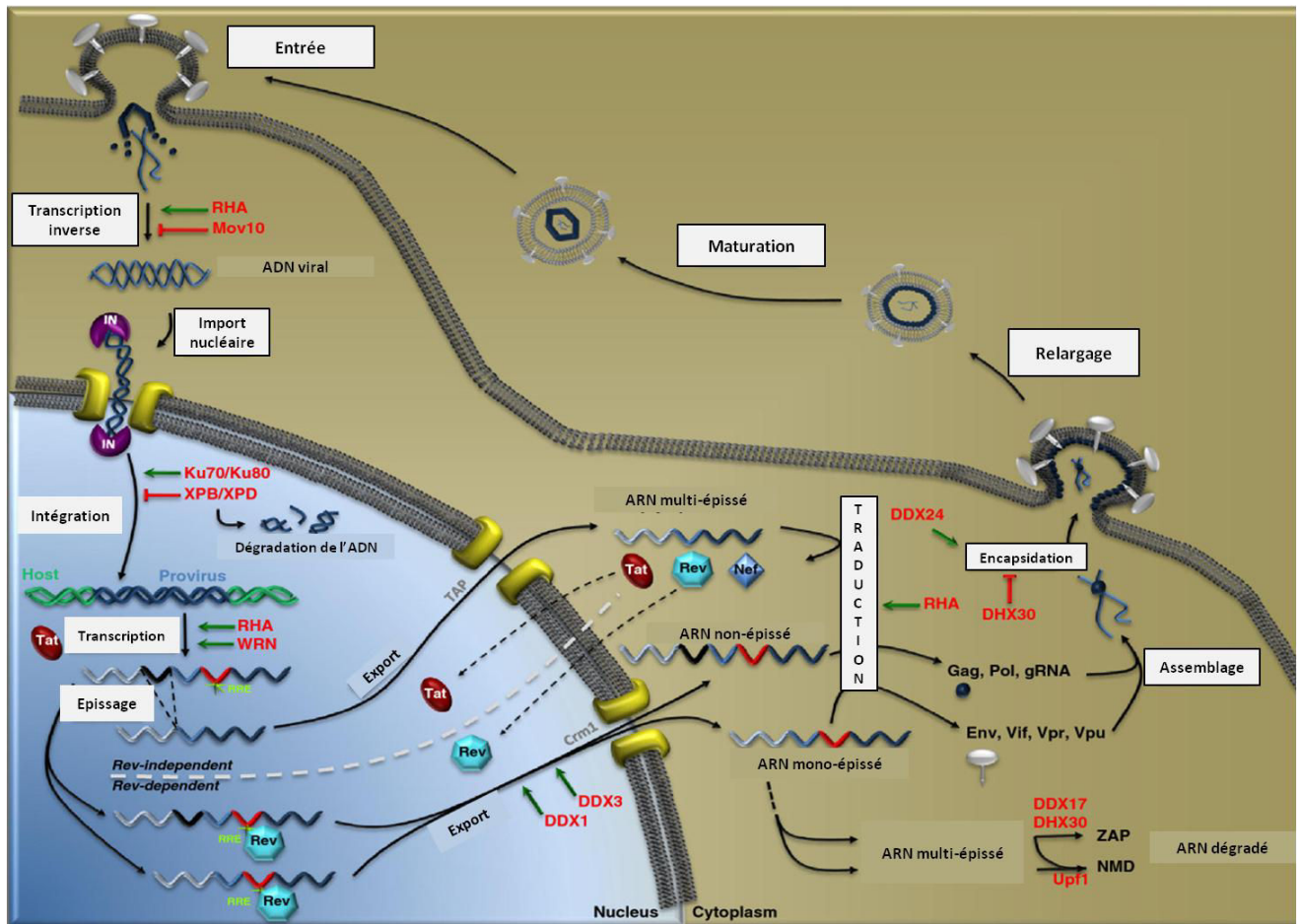


Figure 10 : Rôle potentiel des hélicases cellulaires lors de la multiplication du VIH. Adaptée de (Lorgeoux et al., 2012). Les hélicases sont impliquées dans tous les mécanismes cellulaires mettant en jeu de l'ADN et de l'ARN. Ci-dessus sont représentés le rôle des hélicases dans le cycle de réplication du VIH. Les étapes ciblées sont la transcription inverse, l'intégration, la transcription du génome viral, l'export des transcrits viraux dans le cytoplasme ainsi que l'assemblage des supports génétiques du virus à la membrane cellulaire. Certaines permettent l'accomplissement de ces étapes alors que d'autres sont responsables de leur inhibition.

transcrits via des pores nucléaires (Yedavalli et al., 2004). Une autre protéine indispensable à l'activité de Rev est la protéine CRM1 (chromosomal maintenance 1), ou exportine 1, qui permet l'export des transcrits viraux. Une fois les protéines virales produites, elles sont transportées à travers la cellule, par des éléments du cytosquelette, jusqu'à la membrane afin d'y être assemblées. Cette étape d'assemblage est facilitée par l'interaction du précurseur Gag avec des éléments cellulaires et viraux ainsi que par l'inclusion de protéines d'enveloppe au sein de la membrane plasmique de la cellule. La membrane et ses constituants pourraient être considérés comme cofacteurs du virus étant donné leur implication dans la formation des particules virales.

Il existe donc une balance entre l'activité des cofacteurs qui est opposée à celle des facteurs inhibiteurs de l'infection virale.

1.3.2 – Les hélicases dans le cycle de réplication viral

Les hélicases sont des éléments essentiels pour tous les processus biologiques impliquant de l'ARN et de l'ADN (la transcription, la traduction, la recombinaison, la réparation de l'ADN,...). Elles sont responsables de l'hydrolyse de nucléotides tri-phosphate et utilisent l'énergie de l'ATP (adénosine triphosphate) pour modifier la structure des acides nucléiques. Cette énergie permet de catalyser l'ouverture et le déroulement de l'ADN ou de l'ARN selon la spécificité des hélicases. Il existe plusieurs familles d'hélicase chez les eucaryotes, qui sont caractérisées par les motifs qu'elles possèdent et l'homologie entre leurs séquences. Le génome humain code environ 95 hélicases différentes (2/3 pour l'ARN et 1/3 pour l'ADN). Leurs propriétés enzymatiques sont définies par leur orientation (5' - 3' ou 3' - 5'), leur processivité et leur taux de translocation (capacité à hydrolyser les nucléotides sur un même brin) et le nombre d'oligomère formant l'enzyme active. De manière surprenante, le virus ne code pas de telles protéines alors que le cycle de réplication contient plusieurs étapes impliquant des processus de modification de l'ARN et de l'ADN. Dans cette perspective, il apparaît que les hélicases doivent être détournées par le virus ou alors constituer des éléments limitant la multiplication virale (Figure 10).

La première étape du cycle viral faisant appel à des hélicases est la transcription inverse. Ce processus est la cible de 2 hélicases, RHA (RNA helicase A) et Mov10 (Moloney leukemia virus 10 homolog). RHA est liée à Gag et encapsidée dans les particules virales libérées dans le cytoplasme des cellules infectées (Roy et al., 2006). RHA augmente l'efficacité de l'étape de transcription inverse en facilitant l'hybridation de l'ARN de transfert Lys3 qui sert d'amorce à la RT. En contrepartie, l'hélicase Mov10 inhibe la transcription inverse par un mécanisme encore indéterminé. Plusieurs

hypothèses ont été soumises, selon lesquelles Mov10 met en défaut les étapes tardives de la transcription inverse mais plusieurs étapes semblent être affectées par Mov10 (Burdick et al., 2010).

Le rôle des hélicases n'a pas été précisément identifié lors de l'étape d'intégration du VIH. Par exemple, l'hélicase DDX19A a été identifiée en lien avec le PIC mais est aussi capable d'interagir avec CRM1 qui favorise l'export nucléaire des ARNm vers la machinerie de traduction. En 2008, un crible de protéines partenaires de l'intégrase d'un rétrovirus murin a mis en évidence de nombreuses hélicases et il est fort probable que les hélicases citées jouent un rôle dans l'intégration (Studamire and Goff, 2008). Concernant l'intégration du VIH, un rôle indirect des hélicases peut être supposé grâce aux mécanismes de réparation de l'ADN. En effet, les formes non-intégrées de l'ADN viral peuvent être catalysées par la voie NHEJ (non-homologous DNA end joining). La diminution de l'expression de l'hélicase centrale de cette voie, Ku70/80, diminue l'intégration du VIH dans une lignée lymphocytaire. En 2011, une étude sur l'implication des protéines des différentes voies de réparation de l'ADN dans l'intégration du VIH a mis en évidence des hélicases des voies BER (Base excision repair), ERCC6, et NER (nucleotide excision repair), XPB et XPD, comme requises pour la réplication virale (Espeseth et al., 2011).

Durant la transcription et la réplication, les hélicases permettent l'ouverture de l'ADN. Dans le contexte de l'infection par le VIH, de multiples hélicases sont impliquées. Il a été décrit que les hélicases WRN (Werner syndrome) et RHA favorisent la transcription. L'hélicase WRN est capable de délier des structures d'ADN complexe pouvant bloquer la progression des fourches de réplication. Cette hélicase peut interagir avec Tat, augmenter le recrutement au niveau du LTR de facteurs de transcription tels que p300/CBP et favorise la transactivation (Sharma et al., 2007). Il a été démontré que l'hélicase RHA est capable d'interagir avec la structure TAR favorisant la synthèse de transcrits viraux (Fujii et al., 2001), mais aussi avec l'hélicase WRN, augmentant son activité exonucléase (Friedemann et al., 2005). Ces hélicases agissent en synergie pour augmenter la transcription basale et Tat-dépendante à partir du LTR.

Les transcrits sont ensuite pris en charge par la protéine virale Rev qui par l'intermédiaire de sa liaison avec CRM1 peut exporter les ARN partiellement et non épissés jusqu'à la machinerie de traduction. Deux hélicases peuvent favoriser cette étape, DDX3 et DDX1. DDX3 agit comme un effecteur de la voie d'export nucléaire médiée par CRM1. En effet, l'expression d'un dominant négatif ou l'extinction de l'expression de DDX3 réduit la réplication virale (Ishaq et al., 2008). Quant à DDX1, elle favorise l'oligomérisation de Rev au niveau de la séquence RRE, condition indispensable à l'export des ARN. Ces 2 hélicases agissent de manière séquentielle, DDX1 en recrutant de

nombreuses copies de Rev exposant leur séquence d'export nucléaire et DDX3 en favorisant la voie de transport jusqu'au cytoplasme.

Certains transcrits exportés dans le cytoplasme, liés de manière non covalente par une séquence présente sur les éléments non codants en 5', sont directement transportés jusqu'au site d'assemblage des particules virales. Les dernières hélicases jouant un rôle dans le cycle viral sont DDX24 et DHX30 (DEAH-box helicase 30). Il semblerait que DDX24 puissent interagir avec Rev et modeler la structure des ARN afin qu'ils soient encapsidés. A contrario, la surexpression de DHX30 inhibe l'encapsidation des ARN viraux (Zhou et al., 2008b). L'hypothèse est que cet effet serait lié à son implication dans le phénomène de dégradation des ARN viraux dépendant de ZAP (zinc-finger antiviral protein) (Ye et al., 2010).

Les hélicases sont des acteurs majeurs dans le cycle de réplication viral, impliquant une multitude de mécanismes cellulaires. Contrairement à ce que l'on pourrait croire, les hélicases ne sont pas toutes des facteurs facilitateurs de l'infection, elles peuvent aussi inhiber la multiplication du virus.

Un acteur dans le cycle de réplication a attiré notre attention, le complexe TFIIH. Ce complexe possède deux rôles, il est indispensable à l'initiation de la transcription et permet la réparation de l'ADN après certains types de lésions. Un de ses composants, l'hélicase XPB (Xeroderma Pigmentosum groupe B) a tour à tour été décrite comme un inhibiteur et un cofacteur de l'infection par le VIH.

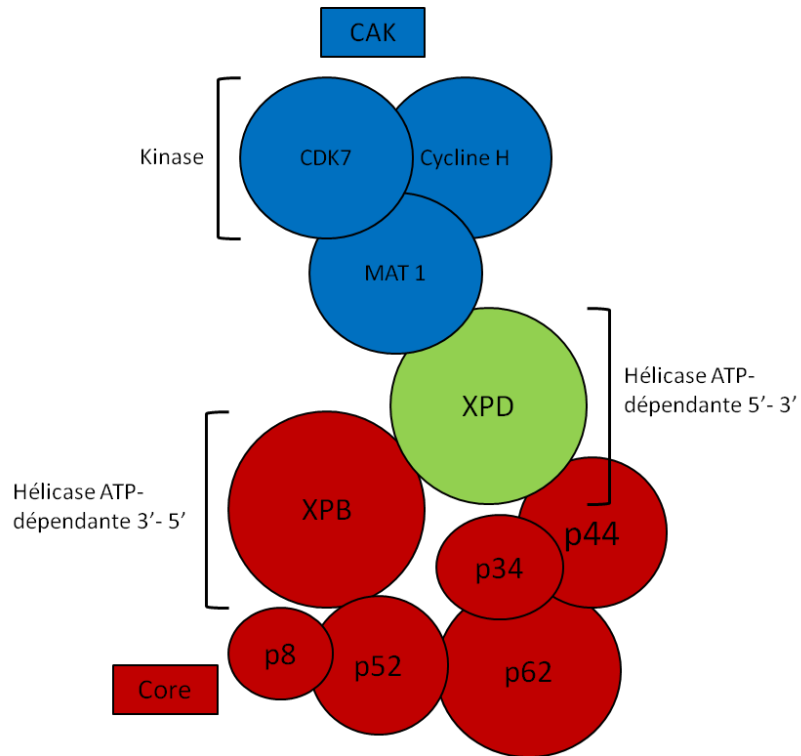


Figure 11 : Composition du complexe TFIIF chez l'Homme. Adaptée de (Compe and Egly, 2012). *TFIIF est un complexe, composé de 10 sous unités, divisé en 3 parties. La partie CAK comprend l'activité catalytique kinase, la partie Core comprend l'hélicase XPB impliquée dans l'ouverture de l'ADN ainsi que les protéines régulatrices des activités hélicases du complexe et enfin l'hélicase XPD, de polarité inverse à XPB.*

2 – Le complexe TFIIH et son hélicase XPB

L'activation des gènes cellulaires codant est dépendante pour la majorité du génome de la transcription par l'ARN Pol II, de facteurs de transcription, et de protéines permettant le remodelage de la chromatine ; tous ces éléments travaillent de concert pour permettre l'expression complète des gènes afin de synthétiser des protéines. Il arrive que certains événements mettent en péril l'intégrité du génome cellulaire et par conséquent l'efficacité de la transcription peut être affectée. De ce fait il existe des mécanismes capables de réparer le génome. Ces réparations limitent l'impact de ces lésions sur l'ADN potentiellement causées par des agents génotoxiques, des UV (Ultra-violet) ou des composés chimiques. Les lésions induites par ces agents et réparées par le complexe TFIIH sont des photo-produits de pyrimidines associés sous formes de dimères de cytosines ou de thymines, créant des mésappariements de l'ADN pouvant être très volumineux.

2.1 – Le complexe TFIIH chez l'Homme

Le complexe TFIIH est donc impliqué dans des événements cellulaires fondamentaux permettant la multiplication et la survie des cellules. Il a été identifié et caractérisé comme jouant un rôle à la fois dans la transcription et la réparation de l'ADN via ses activités hélicases et ATPases (Schaeffer et al., 1993).

Le complexe est divisé en trois parties (Figure 11) et possède des activités enzymatiques intrinsèques: le Core qui contient l'hélicase XPB et cinq protéines régulatrices nécessaires aux activités catalytiques du complexe. Le CAK (Cdk-activating kinase) est un complexe tripartite composé de CDK7, la cycline H et MAT1 (Ménage à trois 1). Enfin l'hélicase XPD (Xeroderma Pigmentosum groupe D) sert de lien entre le Core et la partie CAK du complexe. Le complexe CAK peut être retrouvé seul, associé uniquement à XPD ou alors comme partie de TFIIH. Les trois sous-unités porteuses de l'activité catalytique sont les plus importantes du complexe. En effet, grâce à ces activités, TFIIH est responsable de l'échappement du promoteur lors de la transcription par l'ARN Pol II (Dvir et al., 1997; Moreland et al., 1999), est impliquée dans la voie NER (Weber et al., 1990; Weeda et al., 1991) et dans la régulation du cycle cellulaire. Enfin TFIIH est capable de phosphoryler le CTD de l'ARN Pol II (Lu et al., 1992) et cela contrôle l'initiation de la transcription (Serizawa et al., 1993). Dans les années 90, ces découvertes ont permis de mettre en évidence une connexion potentielle entre la transcription, la réparation de l'ADN et le cycle cellulaire.

2.1.1 – Composition de TFIIH

Il est composé de 10 protéines distinctes, ayant chacune une activité spécifique, assemblées afin de former une architecture complexe (Luo et al., 2015). Le complexe et toutes les protéines qui le compose possèdent leurs homologues chez la levure et les protéines homologues partagent certaines fonctions.

2.1.1.1 – Les protéines du Core

La plus grosse protéine du Core est la protéine XPB dont le rôle sera détaillé plus loin. La protéine p52 est liée directement à la protéine XPB et semble jouer un rôle important dans sa localisation au sein du complexe ainsi que dans la régulation de son activité. En effet, la déstabilisation de cette interaction réduit fortement l'activité de la protéine ainsi que la transcription. La protéine p8 semble également permettre une transcription optimale en régulant l'activité ATPase de la protéine XPB. La protéine p62 interagit avec des facteurs de transcription ou de la voie NER selon l'implication de TFIIH dans une voie ou l'autre mais a également un rôle dans la structure du complexe. La protéine p44 interagit avec XPD et p34. Son interaction avec XPD permet de réguler l'activité hélicase de cette dernière car la rupture de cette liaison entraîne une diminution importante de l'activité de la protéine. L'homologue de p44 chez la levure possède une activité E3 ubiquitine ligase qui n'a pour l'instant pas été caractérisée pour son homologue humain. Enfin la protéine p34, fortement liée à p44 jouerait un rôle dans la stabilité de la structure du complexe.

2.1.1.2 – La protéine XPD

XPD est une hélicase de polarité 5' – 3' dépendante de l'ATP. Elle peut être associée seule au complexe CAK ou alors fait la liaison entre le Core et la partie CAK de TFIIH. Son activité hélicase et sa présence au sein de TFIIH sont indispensables à la réparation de l'ADN par la voie NER alors que des mutations abolissant ses activités enzymatiques n'affectent que très faiblement la transcription (Tirode et al., 1999). La délétion totale du gène est létale chez les souris, de même que la délétion de l'homologue chez la levure. Les mutations qui se situent dans les domaines catalytiques et dans le domaine d'interaction avec son activateur p44, sont donc à l'origine de maladies génétiques rares associées à des défauts de réparation de l'ADN ou de transcription : Xeroderma Pigmentosum (XP), la Trichothiodystrophie (TTD) mais aussi le syndrome de Cockayne (CS) (Johnson and Squires, 1992).

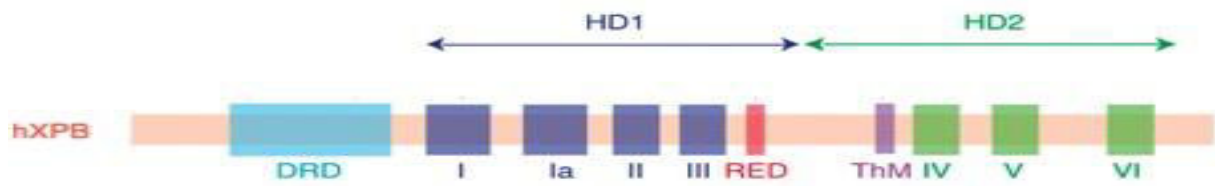


Figure 12 : Représentation schématique du gène de la protéine XPB humaine et ses différents domaines. Adaptée de (Oksenysh et al., 2009). Le gène codant XPB est localisé sur le chromosome 2 chez l'Homme. La protéine qui en découle est un polypeptide de 762 acides aminés de poids moléculaires 89kDa. La protéine possède sept motifs hélicases regroupés en deux domaines permettant à la protéine d'entourer l'ADN. Trois autres domaines ont été identifiés, DRD (DNA damage recognition domain), ThM (thumb) et le motif RED (R210-E211-D-212). Ces domaines sont indispensables à la fonction hélicase et ATPase de la protéine.

2.1.1.3 – Le complexe CAK

Ce complexe est composé de trois sous unités qui peuvent s'assembler de manière indépendante de TFIIH. La sous-unité portant l'activité catalytique du complexe est la protéine CDK7. Cette protéine kinase possède différents domaines : pour la liaison de l'ATP, une boucle T qui contient les résidus phosphorylés, sérines et thréonines, nécessaires à son activation et enfin un domaine catalytique. Contrairement aux autres kinases dépendantes des cyclines, CDK7 n'a pas besoin que les résidus de sa boucle T soient phosphorylés pour être fonctionnelle. En effet, son association avec la cycline H et MAT1 est suffisante pour que CDK7 soit complètement active. La cycline H sert de régulateur de l'activité de CDK7 au sein de ce complexe ternaire. La protéine MAT1 quant à elle permet la cohésion physique entre les membres de ce complexe et outrepassa la nécessité de phosphorylation de la boucle T de CDK7 pour que le complexe exerce son activité enzymatique. Il a été montré que le rôle de CDK7 dans la transcription générale était peut-être surestimé car dans des souris invalidées pour ce gène, seul un certain nombre de gènes sont affectés et le niveau de phosphorylation de la Ser 5 du CTD n'est pas affecté (Ganuza et al., 2012). Il est possible que d'autres kinases compensent cette absence car le CTD est la cible de nombreuses protéines ayant cette fonction. Ce rôle ambiguë de CDK7 semble être maintenant résolu car des expériences de génomiques ont mis en évidence que des inhibiteurs de cette protéine affectent le niveau de transcrits matures (Kelso et al., 2014). Un second groupe a montré qu'un inhibiteur spécifique, le THZ1, réduit le niveau de phosphorylation de la Ser 5 et entraîne une réduction générale de la présence de l'ARN Pol II sur les promoteurs (Kwiatkowski et al., 2014). La protéine CDK7 est bien nécessaire à la transcription.

CDK7 est aussi responsable de la phosphorylation de facteurs de transcriptions autres que l'ARN Pol II, comme TFIIIE et certains récepteurs nucléaires (Chen, 2000; Ohkuma and Roeder, 1994; Rochette-Egly et al., 1997). Cette régulation par CDK7 peut moduler leurs fonctions et leurs interactions.

2.1.1.4 – La protéine XPB

XPB est une hélicase à ADN de polarité inverse par rapport à celle de XPD, 3' – 5', dépendante de l'ATP. Elle contient de nombreux domaines (Figure 12), sept motifs hélicases regroupés dans deux domaines hélicases (HD), un domaine de reconnaissance des lésions (DRD), un domaine de liaison à l'ADN et un site de liaison de l'ATP situés dans HD1. La protéine XPB contient également dans sa séquence des motifs putatifs de localisation nucléaire qui avec son domaine d'interaction à l'ADN sont indispensables à l'activité de la protéine. Des mutations dans le domaine ATPase entraînent l'impossibilité d'hydrolyser l'ATP mais aussi une perte de la fonction hélicase, délétère pour les cellules. D'autres mutations et notamment dans son domaine de reconnaissance des lésions, ont

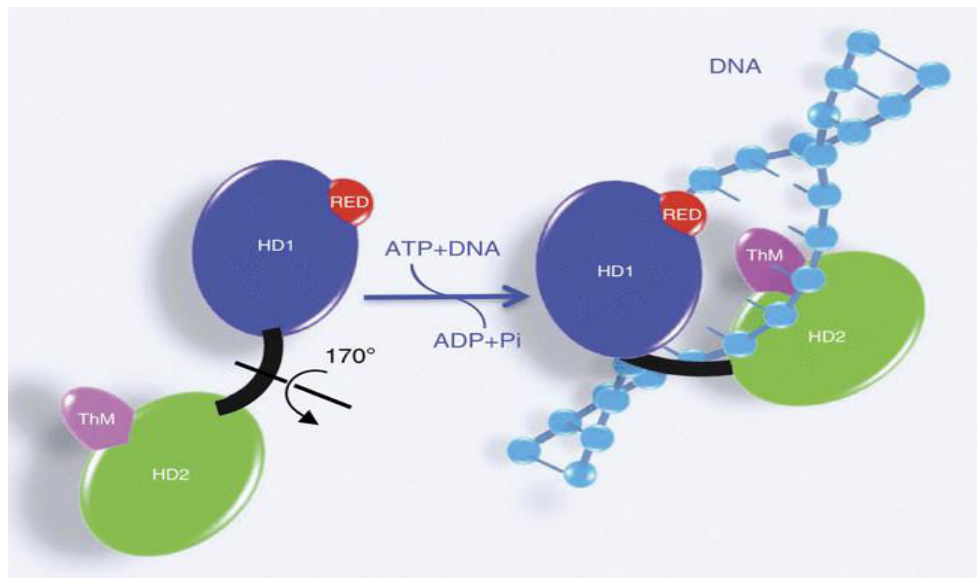


Figure 13 : Fixation de la protéine XPD sur l'ADN et activation de son activité hélicase ATP-dépendante (Oksenysh et al., 2009). La reconnaissance de l'ADN par la protéine induit une rotation de cette dernière autour du double brin. La disposition de la protéine entraîne la mise en place des différents motifs afin qu'ils puissent être dans la meilleure architecture pour une activité catalytique efficace.

permis de mettre en évidence son rôle dans les maladies génétiques citées précédemment pour la protéine XPD (Weeda et al., 1990). La résolution de la structure cristallographique d'un homologue (42% d'homologie dans le domaine central) de la protéine XPB chez une *archae* (Fan et al., 2006) a apporté de nouvelles caractéristiques de la protéine dans les mécanismes de transcription et de réparation. Les différences dans les extrémités C et N-terminale de la protéine, entre l'*archae* et l'Homme, peuvent s'expliquer par la complexité et les différences qu'il existe pour les processus de réparation et de transcription entre les procaryotes et les eucaryotes. Trois domaines de la protéine XPB ont été identifiés chez cet homologue, un domaine DRD impliqué dans la reconnaissance du site de départ de l'activité catalytique lors du processus de réparation de l'ADN. Le motif RED présent dans une boucle reliant les domaines hélicases de la protéine est important pour l'activité hélicase et l'ouverture de l'ADN. Enfin, un domaine ThM permet de lier l'ADN sans reconnaissance spécifique de séquence. Cette capacité est nécessaire pour les changements de conformation induits par les domaines hélicases autour du site où la fonction est requise. RED et ThM sont nécessaires pour l'ancrage de TFIIH au site endommagé sur l'ADN et stimule l'activité ATPase du complexe.

Le domaine DRD est impliqué dans la reconnaissance de l'ADN (Figure 13) et induit une rotation du domaine hélicase 2 (HD2) permettant à la protéine d'envelopper l'ADN. Dans ce schéma, le motif RED est positionné au niveau du site actif de la fonction hélicase mais également ancré au niveau de l'ADN. Le domaine ThM est alors lié à un brin d'ADN en face du motif RED, l'ATP est hydrolysé et l'ADN ainsi ouvert. Récemment il a été montré que la protéine XPB pourrait avoir une action de translocation lors de la transcription (He et al., 2013; He et al., 2016) et que cette fonction pourrait être nécessaire à l'accomplissement de ce processus. Cette activité de translocase dédiée à XPB a également été décrite chez la levure comme ayant une polarité inverse à celle de sa fonction hélicase (Fishburn et al., 2015).

En résumé, la protéine XPB a une fonction hélicase dépendante de l'ATP qui est impliquée, au sein du complexe TFIIH dans deux mécanismes majeurs, la transcription et la réparation de l'ADN.

2.2 – Rôle de TFIIH dans la cellule

TFIIH est présent dans le noyau, composé de tous ses éléments. Les différentes protéines qui forment sa structure et plus particulièrement les hélicases XPB et XPD possèdent des séquences permettant d'ancrer le complexe sur l'ADN afin d'y jouer leur rôle, c'est à dire l'ouverture de double brin d'ADN. Cette liaison à l'ADN permet au complexe d'intervenir dans la transcription mais aussi dans la réparation de l'ADN.

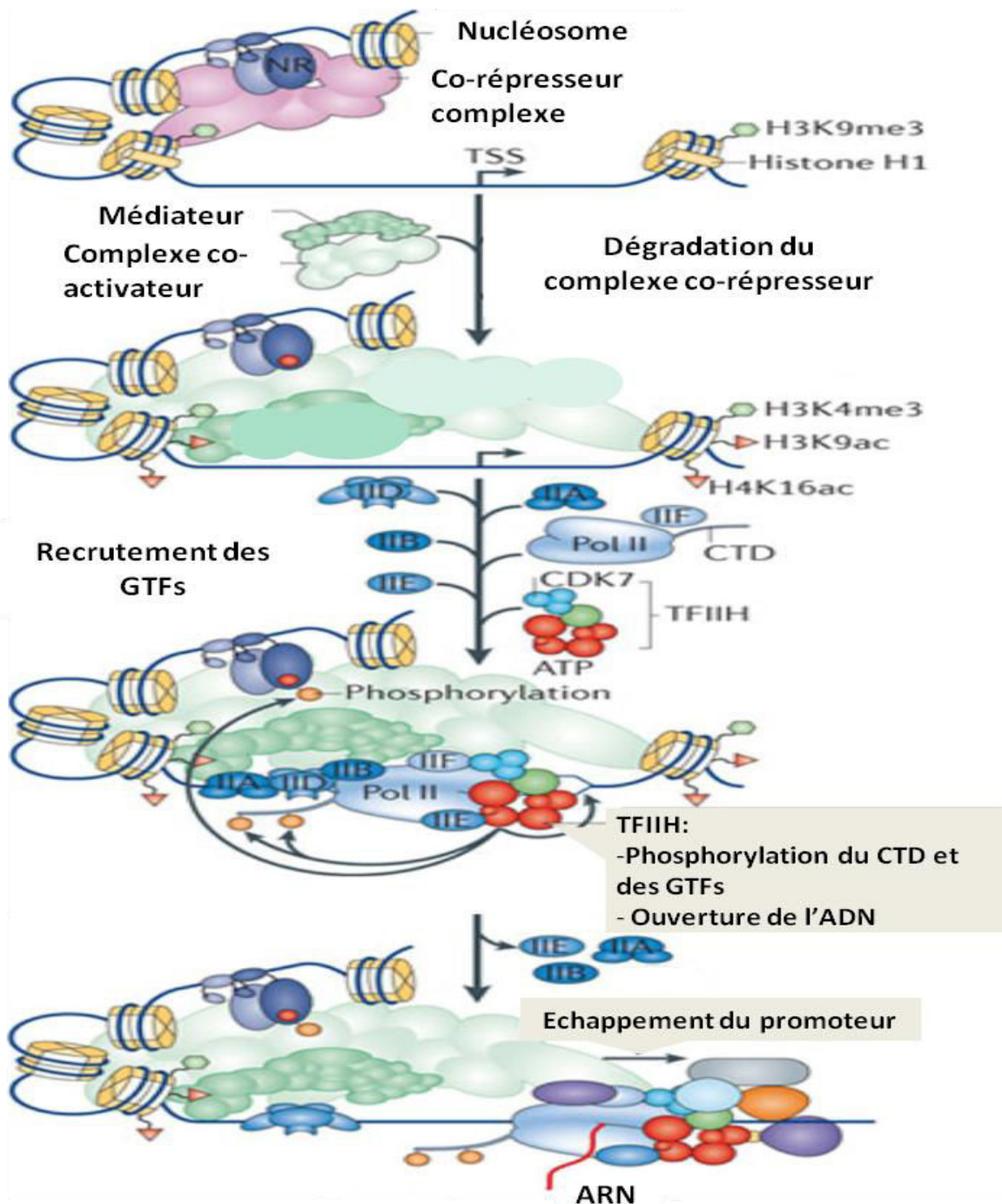


Figure 14 : Mécanisme de transcription basale par l'ARN Pol II. Adaptée de (Compe and Egly, 2012). L'ADN est réprimé par différents facteurs, complexe répresseur et compaction structurale de la chromatine, avant que la transcription ait lieu. Le recrutement du complexe médiateur et des co-activateurs va lever cette inhibition et ainsi les GTFs vont être séquentiellement recrutés. A ce stade, les marques inhibitrices de la chromatine vont être compensées par l'apparition de marques activatrices. Le dernier GTFs recrutés est TFIIF afin de phosphoryler le CTD de la Pol II sur un des résidus sérine. La Pol II progresse le long de l'ADN et les facteurs de transcription commencent à être libéré, on se situe alors dans l'étape d'échappement du promoteur.

2.2.1 – TFIIH dans la transcription

Initialement TFIIH a été identifié comme étant un acteur essentiel de la transcription réalisée par l'ARN Pol II (Conaway and Conaway, 1989; Gerard et al., 1991). La transcription par la Pol II est préposée pour les gènes codants des protéines, les petits ARN nucléaires ainsi que pour les micro ARN. Plus récemment, TFIIH a été décrit comme impliqué dans la transcription des ARN ribosomiaux accomplis par la Pol I (Iben et al., 2002) mais aussi dans les transcriptions effectuées par la Pol III (Barski, 2010; Oler, 2010).

Avant la transcription, l'ADN n'est pas nu attendant que les complexes viennent se fixer et entament la transcription. Le promoteur est maintenu sous forme latente ou éteint par la compaction structurale de la chromatine et par des protéines, associées en complexe de répression. Ces complexes se retrouvent au niveau des nucléosomes et permettent via des modifications post-traductionnelles sur les histones d'inhiber l'expression des gènes. Une des marques de répression les plus courantes est la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (Figure 14). Le recrutement du complexe médiateur et de co-activateurs va entraîner la dégradation du complexe de répression par la voie ubiquitine-protéasome. En parallèle, des modifications post-traductionnelles activatrices vont apparaître, comme les acétylations de l'histone 3 et 4.

Lors de ce processus (Figure 14), les GTFs sont recrutés de manière consécutive au niveau du promoteur avec la Pol II afin de former le complexe de pré-initiation. Le complexe TFIIH est recruté après tous les autres GTFs. Une étude remet en cause ce modèle car elle montre que les complexes TFIIE et TFIIH peuvent être présent au niveau de complexe de pré-initiation (He et al., 2016). Le complexe médiateur est responsable via sa cycline CDK8 de la régulation de TFIIH (Akoulitchev et al., 2000) mais favorise son positionnement au sein du complexe de pré-initiation. A cet instant, la première activité du complexe nécessaire est l'activité d'hydrolyse de l'ATP, exercée par la protéine XPB. Son activité est requise pour l'ouverture de l'ADN (Holstege et al., 1996) ainsi que pour l'échappement du promoteur (Dvir, 1996; Dvir et al., 1997; Moreland et al., 1999). Dans un modèle *in vitro*, il a été montré que l'activité ATPase de la protéine XPB est nécessaire à l'ouverture de l'ADN alors que son activité hélicase est quant à elle responsable de l'échappement du promoteur (Lin et al., 2005). Il a été décrit récemment chez la levure que TFIIH pouvait être absent et que l'ouverture de l'ADN pouvait alors être réalisée par le complexe TFIIE (Plaschka et al., 2016). Après l'ouverture de l'ADN, le CTD (C-terminal domain) de l'ARN Pol II est phosphorylé. En effet, la Pol II existe sous deux états, un état non phosphorylé lors de son ancrage sur la double hélice et une forme hyper phosphorylée lorsqu'elle progresse sur l'ADN. Ces phosphorylations ont lieu sur son CTD où elle possède 52 répétitions (YSPTSPS) qui peuvent être phosphorylés en trois positions différentes, 2,

5 et 7. Ces phosphorylations sont responsables de l'évolution de la polymérase le long du brin d'ADN à transcrire. La protéine CDK7 du complexe TFIIH phosphoryle le CTD de la Pol II en position 5 et 7 ce qui initie la transcription. Une fois que la Pol II a progressé jusqu'au site +50 après le site de départ, elle s'arrête ce qui permet le recrutement du complexe de coiffe et sa mise en place sur l'ARN messager.

La régulation de l'activité catalytique de TFIIH est importante pour l'accomplissement d'un processus complet de transcription. Plus précisément, les membres du complexe CAK, MAT1 et cycline H peuvent réguler l'activité catalytique de TFIIH lors de l'initiation (Rossignol et al., 1997). En effet, la délétion de MAT1 réduit la phosphorylation en position 5 du CTD de la Pol II et la phosphorylation de la cycline H réprime l'activité du complexe CAK. Après la pause, les complexes nécessaires à l'élongation sont recrutés et permettent ainsi de finaliser le processus de transcription. TFIIH intervient de manière indirecte dans le processus d'élongation car il est relargué au cours de la progression de la Pol II. Cette libération de TFIIH permet au complexe P-TEFb de phosphoryler la position 2 du CTD de la Pol II et ainsi initier l'élongation de la transcription. Le CTD de la Pol II subit une régulation extrêmement fine car d'autres acteurs cellulaires de type kinase (CDK2, CDK8, ERK1) et phosphatase sont capables d'intervenir dans le statut de phosphorylation de la Pol II et donc de réguler la processivité de la Pol II. Tous ces contrôles permettent de former une chronologie précise dans la mise en place de la transcription.

Outre son rôle dans la transcription basale et celle médiée par la protéine Tat du VIH, il a été décrit que TFIIH jouait un rôle important dans la régulation d'activateurs transcriptionnels tels que la protéine VP16 du virus de l'herpès, la protéine EBNA2 du virus Epstein-Barr mais aussi de la protéine HBx du virus de l'hépatite B (Xiao et al., 1994) (Tong et al., 1995) (Qadri et al., 1996).

2.2.2 – TFIIH dans la réparation de l'ADN

La réparation de l'ADN est un mécanisme nécessaire au maintien de l'intégrité du génome et à la synthèse efficace des protéines permettant l'accomplissement des différentes fonctions cellulaires et la survie des cellules. Il existe de nombreuses voies de réparation qui sont caractéristiques du type de modifications de l'ADN. La voie NER est capable de réparer des lésions qui ont comme particularité commune une distorsion de la double hélice. Ces modifications de la structure de la double hélice, adduit d'ADN volumineux tels que les photoproduits 6-4 et les dimères de thymines, mettent en péril la progression des polymérases pendant la réplication et la transcription car TFIIH intervient entre autre dans la réparation de l'ADN de gènes transcriptionnellement actifs. La réparation par

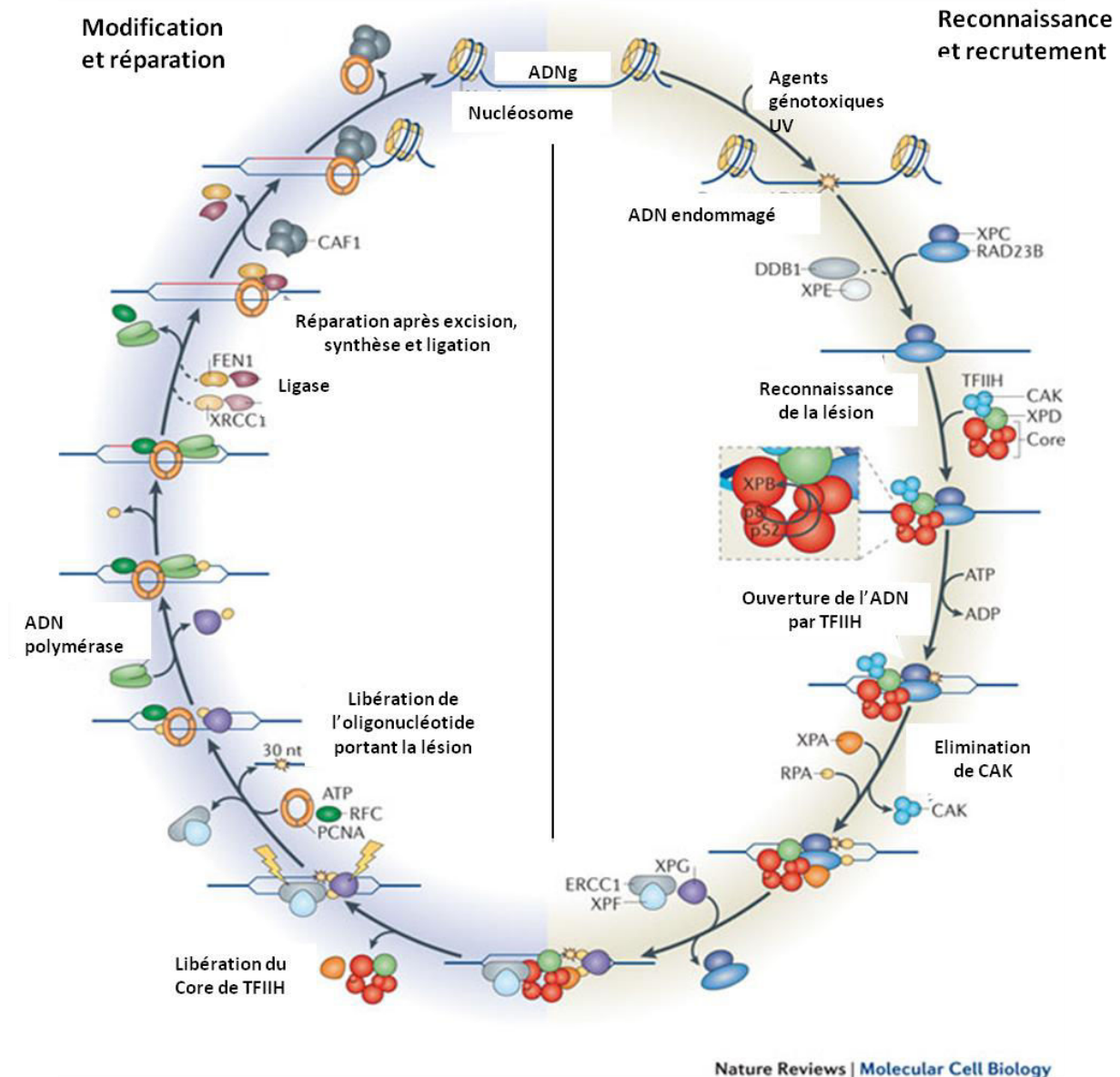


Figure 15 : Mécanisme GGR de réparation de lésions causés par des agents exogènes. Adaptée de (Compe and Egly, 2012). Après les modifications subies, les mécanismes de reconnaissance qui scannent en permanence le génome vont venir se lier à proximité de la modification. XPC-RAD23b et/ou UV-DDB reconnaissent la liaison et entraînent le recrutement de TFIIH au site de la lésion. Les activités enzymatiques du complexe vont permettre l'ouverture et le déroulement de l'ADN de manière ATP-dépendante, sous le contrôle d'autres sous unités du complexe. XPA et RPA sont alors recrutées sur le brin lésé ce qui permet la libération du CAK. Le relargage de CAK est nécessaire au recrutement des endonucléases XPF et XPG et à la libération de XPC-RAD23b. TFIIH est éjecté du site de lésion et les endonucléases coupent le brin à ces extrémités 5' et 3'. Les facteurs nécessaires à la réplication et à la polymérisation du nouveau brin sont alors recrutés. L'étape finale est le recrutement de la ligase, qui va reconstituer le double brin d'ADN, et des histones qui vont reformer le nucléosome.

excision de nucléotides intervient donc dans la cellule lorsque l'ADN est lésé par des éléments extérieurs tels que les UV ou des composés chimiques (génétoxique) et notamment ceux utilisés durant le traitement de cancers (Nospikel, 2009). Ces composés entraînent des modifications de structure de l'ADN et donc ce système permet de corriger les lésions déformantes du génome (dimères de pyrimidines ou de thymine), limitant ainsi l'apparition de mutations délétères et diminuant le risque d'apparition de cancers et le vieillissement prématuré. L'ADN cellulaire est également la cible de modifications liées à des éléments endogènes comme les espèces réactives de l'oxygène mais aussi par l'instabilité propre à la molécule d'ADN.

La voie NER est communément divisée en deux mécanismes et le complexe TFIIH participe à ces deux processus de réparation. Ces mécanismes correspondent à la réparation globale du génome (GGR), appelé Global Genomic – NER, permet la réparation entière du génome et notamment des parties non transcrites et la réparation couplée à la transcription (TCR), appelée Transcription coupled – NER, corrigent les lésions bloquant la progression de la Pol II (Bohr et al., 1985; Mellon et al., 1987).

2.2.2.1 – La réparation globale du génome

La voie GGR peut éliminer toutes les lésions, causées par des composants exogènes et endogènes, entraînant des modifications volumineuses de l'ADN et plus particulièrement sur les parties non codantes du génome. Les protéines impliquées dans cette voie de réparation sont maintenues à un niveau d'expression très faible de manière basale et sont exprimées après activation des signaux cellulaires. Le rôle principal de TFIIH dans la voie NER est d'ouvrir l'ADN autour de la lésion, favoriser l'excision du brin lésé et permettre son remplacement par un nouveau fragment d'ADN.

La GGR peut être séparée en deux parties, la reconnaissance et le recrutement des facteurs nécessaires à la réparation puis la modification et la réparation du brin (Figure 15). Tout d'abord, la première étape de toutes les voies de réparation de l'ADN est la reconnaissance de la lésion. Cette reconnaissance est médiée par la protéine Xeroderma pigmentosum groupe C (XPC) qui va modifier la structure de la double hélice ce qui permet la reconnaissance et le recrutement des autres intervenants (Sugasawa, 2001). XPC est associée à la protéine RAD23b (Masutani et al., 1994) et il a été décrit que son homologue chez la levure a pour fonction de stabiliser XPC sur le brin endommagé (Ng et al., 2003). Une fois XPC au niveau de la structure à remplacer, le complexe TFIIH est recruté. Ce recrutement se fait grâce à l'interaction entre XPC et deux sous-unités de TFIIH, p62 et XPB (Bernardes de Jesus et al., 2008). TFIIH va permettre d'ouvrir l'ADN et de le dérouler au niveau du site de la lésion. Cette ouverture est réalisée par deux activités enzymatiques du complexe. La première activité nécessaire est l'activité ATPase de la protéine XPB. En effet, XPB va favoriser la

liaison du complexe TFIIH à la chromatine endommagée grâce à un changement de conformation qui va mettre face à face les domaines RED et ThM (identique au processus décrit pour la transcription) faisant suite à l'hydrolyse de l'ATP (Coin et al., 2007). Cette étape est régulée par deux sous-unités du complexe, p52 et p8 ainsi que par XPC. p8 est un acteur majeur de la régulation de la fonction de la protéine XPB dans la réparation de l'ADN car il stimule l'activité ATPase entraînant la formation d'un complexe efficace pour la réparation. La régulation de l'hydrolyse de l'ATP est essentielle car c'est l'énergie nécessaire à l'activité suivante. Effectivement, la seconde activité enzymatique indispensable à l'ouverture de l'ADN est l'activité hélicase de la protéine XPD. Il a été montré que l'activité hélicase de la protéine XPB pouvait intervenir dans la voie NER mais en absence de l'activité hélicase de la protéine XPD, régulée par la protéine p44, l'ouverture de l'ADN est fortement restreinte (Coin et al., 1998; Tirode et al., 1999). Il a été suggéré que la protéine XPD pouvait également servir de vérification de la lésion de l'ADN et ainsi participer indirectement à la reconnaissance des dommages de l'ADN. Ensuite, les protéines Xeroderma pigmentosum groupe A (XPA) et la protéine de réplication A (RPA) sont recrutées sur le simple brin ouvert. XPA va permettre de maintenir et d'élargir l'ouverture de l'ADN à proximité de la lésion mais également de libérer le complexe CAK de TFIIH qui ne semble pas jouer de rôle majeur dans ce processus. Les endonucléases Xeroderma pigmentosum groupe G (XPG) et Xeroderma pigmentosum groupe F (XPF) se positionnent en 3' et 5' du brin (Evans et al., 1997). XPC est libéré et le Core de TFIIH et XPA sont à leur tour relargués du site de lésion. Une incision par XPF en 5' du brin va entraîner le recrutement de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), RCF (Replication Factor C) et d'une ADN polymérase. Simultanément, XPG va lui aussi couper le brin d'ADN lésé pour éliminer un oligonucléotide d'une taille comprise entre 20 et 30 nucléotides, portant la lésion initiale, libérant simultanément XPG, XPF et RPA. La polymérase, en collaboration avec RCF et PCNA, va alors synthétiser le nouveau brin d'ADN qui sera ensuite lié au double brin par une ligase. A la fin du processus, le double brin sera ensuite modifié afin de retrouver sa place au sein de la double hélice compactée par les nucléosomes.

TFIIH joue un rôle extrêmement important car les activités enzymatiques de ses sous-unités accompagnées des protéines régulatrices participent à la reconnaissance de la lésion et à l'ouverture de l'ADN à réparer. L'arrêt brutal du processus et l'impossibilité de réparer certaines lésions sur l'ADN sont responsables de défauts irréversibles au sein du génome.

2.2.2.2 – La réparation couplée à la transcription

La TCR est un mécanisme qui varie légèrement de celui décrit pour la réparation globale. La différence majeure est que ce processus de réparation intervient uniquement sur des brins d'ADN exprimant des gènes codants, toujours lésés par les éléments impliquant la voie NER.

La reconnaissance est la première chose qui diffère entre les deux voies car pour la TCR, elle se fait grâce à l'arrêt de la polymérase en phase d'élongation. Les protéines impliquées dans cette reconnaissance ont été identifiées car des malades, porteurs de syndrome de Cockayne, étaient incapables de réparer les lésions sur les gènes en transcription, causées par des UV (van Hoffen et al., 1993). Deux protéines ont alors été identifiées comme indispensables pour l'assemblage du complexe de réparation associé à la Pol II, une E3 ubiquitine ligase CS groupe A (CSA) et une ATPase dépendante de l'ADN, CS groupe B (CSB) capable via son activité de modifications de la structure de la chromatine (Fousteri et al., 2006; Lainé and Egly, 2006). D'autres partenaires furent identifiés au niveau de la Pol II et de CSA/CSB, une protéine interagissant avec la Pol II en phase d'élongation et qui stabilise CSB, UV-sensitive syndrome protein A (UVSSA). CSA est responsable du recrutement de XPA binding protein 2 (XAB2) qui permet le recrutement de XPA et l'assemblage du complexe de réparation. A la suite de cette étape, le processus de réparation rejoint celui de GGR avec le recrutement de TFIIH et l'ouverture de l'ADN (décrit dans la partie précédente).

2.2.3 – Conséquences de la dualité transcription/réparation de TFIIH

Ce complexe est impliqué dans deux mécanismes essentiels pour le maintien de la survie cellulaire. En effet, le rôle majeur que joue le complexe TFIIH dans les étapes précoces de la réparation de l'ADN et la transcription, fait de ce dernier un élément qui doit être maintenu dans son intégrité structurale et génomique.

On peut supposer que des mutations affectant des composants du complexe TFIIH puissent modifier son assemblage, sa structure mais également les fonctions auxquelles ils participent. Effectivement, des mutations dans certaines sous-unités sont à l'origine de maladies autosomiques récessives telles que CS, XP et TTD. Les acteurs de TFIIH touchés par ces mutations sont les protéines XPB, XPD et p8. Pour la protéine XPB, on retrouve parmi ces syndromes 3 mutants alors que pour la protéine XPD, plus de 20 mutants sont référencés, laissant supposer le rôle essentiel de la protéine XPB.

La maladie appelée XP est provoquée par des mutations sur les gènes codants les protéines XPB et XPD. Elle est caractérisée par un ensemble de symptômes provoquant une pigmentation anormale et l'assèchement de la peau après une exposition au soleil et surtout un risque, pouvant augmenter

d'un facteur 1000, de développer des cancers de la peau (Cleaver, 2005). Dans certains cas, XP peut également être associé à un syndrome CS entraînant alors des retards mentaux et des malformations oculaires et squelettiques (Nance and Berry, 1992). Cette maladie est également liée à des mutations de XPB et XPD entraînant des défauts de réparation dans le mécanisme de TCR alors que XP présente des défauts de réparation au niveau du mécanisme de GGR. Enfin, TTD peut être associée à des mutations sur les gènes de XPB, XPD et p8. Cette maladie est caractérisée par des problèmes neurologiques, des retards de croissance, des problèmes de stérilité (Hashimoto and Egly, 2009). Ces différents syndromes ont été caractérisés depuis leur découverte comme des maladies de la réparation de l'ADN (Lehmann, 2003) mais des évidences laissent supposer que des défauts de transcription peuvent également jouer un rôle dans ces syndromes (Singh et al., 2015).

Dans cette même ligne d'idée, il est plausible que les membres du TFIIH soient des acteurs privilégiés pour des parasites qui ont pour but de détruire les cellules ou alors de favoriser leur fonction afin d'augmenter la réplication cellulaire nécessaire à leur multiplication. En effet, l'inhibition du complexe TFIIH entraînerait des défauts de réparation et de transcription qui peuvent être irréversibles. Un exemple est le détournement des protéines p44 et XPB par le virus de la fièvre hémorragique de la vallée du Rift qui va relocaliser ces protéines dans des structures filamenteuses afin de prévenir la formation du complexe et d'inhiber l'activité de la protéine XPD (Le May et al., 2004). Ce détournement de TFIIH diminue la transcription cellulaire permettant au virus d'échapper au système immunitaire. Le second exemple est la dérégulation transcriptionnelle et protéique des protéines XPB et XPD par le virus de l'hépatite B et sa protéine HBx (Jaitovich-Groisman et al., 2001) afin de d'inhiber la voie de réparation NER pour favoriser les mutations et l'apparition de cancers.

2.2.4 – Relation connue entre XPB et le VIH

La protéine XPB n'a pas de fonction seule en dehors du complexe et de son association avec les autres protéines capables de réguler son activité. Les deux activités catalytiques qu'elle porte sont indispensables dans la réparation de l'ADN et la transcription de l'ARN. Dans la voie de réparation, son activité ATPase est requise alors que son activité hélicase n'est pas indispensable, contrairement à celle de la protéine XPD, mais les 2 activités de la protéine XPB sont essentielles dans la transcription.

Depuis les années 2000, quelques groupes se sont intéressés au rôle de la protéine XPB lors de la réplication du VIH. En 2001, Zhou et ses collaborateurs ont démontré *in vitro* dans des cellules HeLa que le complexe TFIIH et plus précisément la protéine XPB était responsable de l'inhibition de l'autophosphorylation de P-TEFb, nécessaire à la fixation du complexe Tat/P-TEFb sur TAR pour une

élongation efficace (Zhou et al., 2001). P-TEFb ne peut pas subir les phosphorylations qui vont activer les fonctions du complexe avant que le complexe TFIIH ne soit libéré, entre +30 et +50, lors de la transcription et du passage entre l'échappement du promoteur et l'élongation.

En 2006, Yoder et ses collaborateurs ont à leur tour étudié le rôle de la protéine XPB dans le cycle de réplication du VIH (Yoder et al., 2006). Dans cette étude, les auteurs ont utilisé les fibroblastes exprimant la protéine XPB mutée, issues des patients portant les syndromes XP/CS et TTD (abordés dans la partie précédente). La réplication de pseudovirus dérivés du VIH et du Moloney Murine Leukemia virus (MMLV) est augmentée dans les cellules exprimant la protéine XPB mutée. Les pseudovirus recréent uniquement les étapes de la transcription inverse jusqu'à la transcription du génome viral par la machinerie cellulaire. En effet, les formes circulaires 2 LTR et intégrées du virus sont réduites dans les cellules possédant la mutation de la protéine XPB. La conclusion de cette étude est que l'hélicase XPB entraîne la dégradation des ADN rétroviraux réduisant ainsi le réservoir d'ADN pour l'intégration dans le génome cellulaire. Le même groupe a publié un second papier en 2011 dans lequel ils décrivent le rôle de TFIIH comme dégradant les ADN rétroviraux lors de leurs imports nucléaires, grâce à l'activité de réparation du complexe, définissant ainsi XPB comme un facteur inhibiteur de l'infection rétroviral (Yoder et al., 2011) mais d'autres exo ou endonucléases pourraient être impliquées dans ce processus (Espeseth et al., 2011).

En parallèle de ces études, Brass et ses collaborateurs ont identifié XPB comme un facteur nécessaire à l'infection du VIH à travers un criblage par ARN interférence lors de l'infection de cellules HeLa TZM-bl par un virus HIV-IIIB (Brass et al., 2008). Le virus HIV-IIIB a été isolé par l'équipe du Dr Robert Gallo à partir de lymphocytes T infectés, permettant à ce virus de réaliser toutes les étapes du cycle de réplication virale dans les HeLa TZM-bl (HeLa CD4+/CCR5). En 2011, Espeseth et ses collaborateurs ont également mis en évidence la nécessité de la protéine XPB dans l'infection de cellules HeLa P4/R5 par un virus HIV HXB2 (Espeseth et al., 2011).

Ces résultats entre le début des années 2000 et 2011 mettent en avant des recherches différentes avec une issue inattendue. En effet, 2 études mettent en évidence que la protéine XPB est un facteur inhibiteur de l'infection par le VIH. Ces études montrent l'effet de mutants de la protéine XPB, dont la fonction de réparation est fortement diminuée, dans des cellules de patients transduites avec un pseudovirus. Les cellules utilisées ne sont pas des cibles naturelles de l'infection par le VIH.

Les cribles s'opposent aux résultats précédents, dans des cellules qui ne sont pas non plus des cibles directes de l'infection par le VIH mais qui ont été modifiées afin de permettre de multiples tours d'infections. Dans ces cribles, les virus utilisés sont répliatifs c'est à dire qu'ils peuvent accomplir un cycle entier de réplication et produire de nouveaux virions qui à leur tour pourront infecter de nouvelles cellules. Suite à ces données de la littérature, nous nous sommes intéressés au rôle de la protéine XPB lors de l'infection par le VIH et pour ce faire nous avons utilisé un outil décrit en 2014.

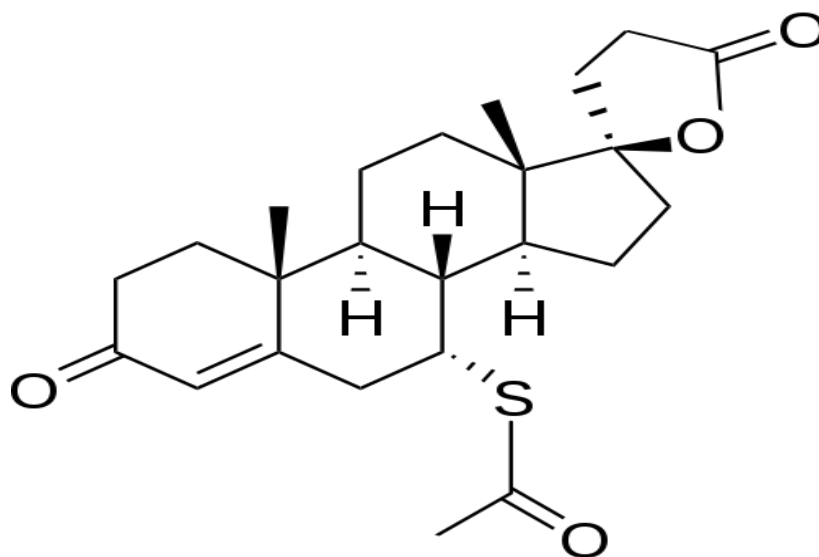


Figure 16 : Représentation de la formule chimique de la spironolactone. C'est un composé organo-sulfuré dont la formule complète est 17-hydroxy-7 α -mercapto-3-oxo-17 α -pregn-4-ene-21-carboxylic acid γ -lactone acetate (C₂₄H₃₂O₄S).

3 - La spironolactone, inhibiteur spécifique de la protéine XPB

Très récemment, Alekseev et ses collaborateurs ont identifié et caractérisé un inhibiteur spécifique de la protéine XPB (Alekseev et al., 2014). Ce composé est responsable d'une dégradation rapide et réversible de la protéine. L'incubation de cellules traitées avec de la spironolactone (SP) et avec des inhibiteurs du protéasome entraîne une récupération complète du niveau d'expression de la protéine. Dans cette étude, la spironolactone est décrite comme un inhibiteur de la voie de réparation NER permettant ainsi de maximiser les effets de thérapies, par des agents génotoxiques ou radiothérapie, contre le cancer.

3.1 - Rôle et description de la molécule

La SP est un composé organo-sulfuré de la classe des stéroïdes (Figure 16). C'est un antagoniste de l'aldostérone, principale hormone minéralocorticoïdienne. L'aldostérone a été découverte en 1953 (Simpson et al., 1953) comme une hormone impliquée dans la régulation des échanges de sodium et de potassium. A partir de cette date, de nombreux stéroïdes synthétiques ont été testés selon leur capacité à bloquer le sodium et contrer les effets de l'excrétion de potassium. La SP entre en compétition avec le récepteur des minéralocorticoïdes (MR) en se liant sur ce dernier à la place de l'hormone avec plus d'affinité.

3.1.1 - Histoire et découverte de la spironolactone

L'histoire de la SP est liée à la découverte et au progrès réalisé concernant les minéralocorticoïdes et plus particulièrement l'aldostérone. Le premier minéralocorticoïde synthétisé a été la déoxycorticostérone, jouant un rôle dans certains processus inflammatoires. La corticostérone est le précurseur de l'aldostérone au niveau du métabolisme. L'étude de cette molécule laisse suggérer que les hormones minéralocorticoïdiennes exercent une activité pro-inflammatoire alors que les hormones glucocorticoïdiennes ont une activité anti-inflammatoire (Selye, 1949). Malheureusement, le rôle dans l'inflammation fut laissé de côté pour se focaliser sur l'hypertension et le rôle dans les échanges ioniques. La spironolactone a été décrite en 1957 comme agent permettant de contrer les effets de l'aldostérone (KAGAWA et al., 1957). En effet, cette molécule permet de diminuer la concentration sodique mais aussi de modérer la rétention du potassium de manière dépendante du MR. Après le premier cas d'hyperaldostéronisme primaire (ou syndrome de Conn), la spironolactone

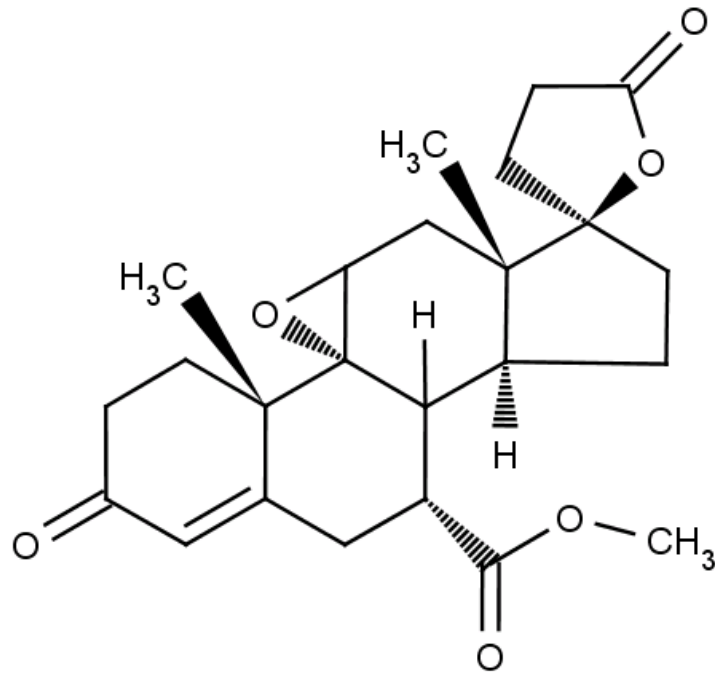


Figure 17 : Représentation de la formule chimique de l'éplérénone. *Composé de la classe des stéroïdes de formule 9,11 α -Epoxy-17-hydroxy-3-oxo-17 α -pregn-4-ene-7 α ,21-dicarboxylic acid, gamma-lactone, methyl ester (C₂₄H₃₀O₆).*

a été considérée comme le traitement le plus efficace permettant de réguler la pression sanguine et la kaliémie, avant l'acte chirurgicale. En effet, l'hyperaldostéronisme est due pour environ 30% des cas à la présence d'un adénome ou d'un carcinome au niveau des glandes surrénales qui est retiré par opération chirurgicale afin de rétablir l'équilibre ionique.

3.1.2 – Rôle de la spironolactone

Les effets de la spironolactone ne s'appliquent pas uniquement à la régulation du sodium rénale mais participe au maintien de la balance ionique dans de nombreux tissus.

Tout au long de ces années, la SP a été utilisée dans des situations médicales variées comme les cirrhoses du foie, les oedèmes, les défaillances cardiaques, l'hypertension et comme traitement hormonal grâce à son activité anti-androgénique. La prise de SP est à l'origine de l'apparition de plusieurs métabolites dont les principaux sont la canrenone (CAN) et la 7 α -thiométhylspironolactone (7TS). Ces métabolites possèdent la même fonction d'antagoniste de l'aldostérone que la SP. Alors que les effets de l'aldostérone sont définis par sa liaison au MR et leur translocation au noyau. Au contraire, SP, CAN et 7TS lorsqu'ils sont liés au MR sont retrouvés dans le cytoplasme (Lombès et al., 1994). La concentration plasmatique maximale de SP est retrouvée entre 2 et 4h, ce qui explique certainement la dégradation rapide de la protéine XPB, mais est éliminée de la circulation en 8h (Overdiek et al., 1985). Par contre, ses métabolites peuvent être détectés à leur concentration maximale circulante jusqu'à 24h après l'administration de la SP. La prise journalière de cette molécule entraîne une accumulation de la SP mais également de ses métabolites. En 2013, la spironolactone apparaît sur la liste des médicaments essentiels publiée par l'Organisation Mondiale de la Santé.

De façon plus récente, le rôle de l'aldostérone dans l'inflammation a été réévalué car la spironolactone et un analogue de structure, l'éplérénone (EPL) (Figure 17), ont été décrits comme potentielles drogues anti-inflammatoires en bloquant les effets de l'aldostérone (Bendtzen et al., 2003; Chen et al., 2013). Ces deux antagonistes de l'aldostérone agissent de manière rapide et sélective ce qui limite les effets secondaires de ces molécules. Concernant l'éplérénone, elle est métabolisée de manière rapide et ses métabolites sont inactifs.

L'aldostérone a également été associée à l'augmentation du risque de maladies auto-immunes en induisant la polarisation Th17 des lymphocytes CD4+, suggérant de nouvelles possibilités thérapeutiques pour les antagonistes de l'aldostérone tels que la SP et l'EPL. Les antagonistes du MR pourraient être repositionnés dans le traitement de nombreuses situations cliniques.

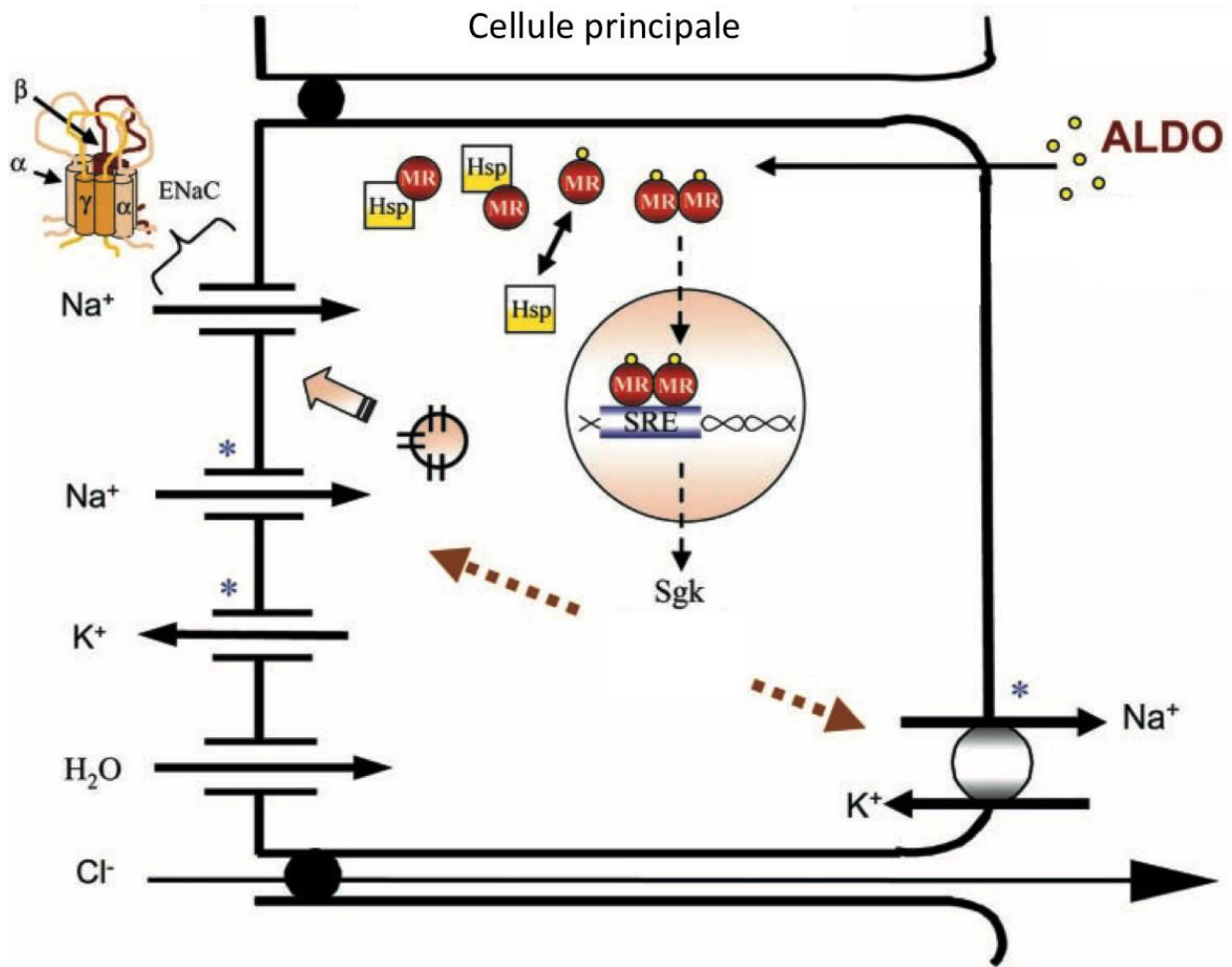


Figure 18 : Représentation schématique simplifiée de l'action de l'aldostérone sur les cellules épithéliales. Adaptée de (Booth et al., 2002). L'aldostérone diffuse à travers la membrane plasmique afin de se lier à son récepteur MR. Le récepteur est ensuite dimérisé et transloqué dans le noyau où il interagit avec des éléments régulant la transcription, les steroid response element (SRE). La protéine majeure régulée par ces éléments de réponse, est la protéine SGK1 qui est une kinase qui va avoir pour fonction de réguler les pompes à sodium, potassium ainsi que la protéine ENaC afin de maintenir la balance ionique dans la cellule.

Un nouveau rôle décrit en 2014 est que les cellules traitées par la SP sont incapables de réparer les lésions, de type dimères de pyrimidines, causées par les UV. Le traitement de cellules en culture avec la SP, diminue fortement la viabilité après des traitements aux UV ou par le cisplatine qui sont des agents engendrant des lésions réparées par le système NER. En effet, la spironolactone entraîne une dégradation protéique rapide, réversible et quasi complète de la protéine XPB. Cette dégradation ne semble pas affecter l'intégrité du complexe selon Alekseev et ses collaborateurs (Alekseev et al., 2014).

3.1.3 – Voie de l'aldostérone

L'aldostérone est produite dans la zone glomérulée des glandes surrénales et permet de maintenir la balance sodique de l'organisme entier (Booth et al., 2002). Les réactions catalytiques menant à l'aldostérone sont stimulées par l'angiotensine, le potassium ou d'autres hormones. La synthèse d'aldostérone va activer le cytochrome P450 qui est responsable de l'oxydation ou de la réduction de nombreuses protéines intracellulaires. Le cytochrome participe également à la détoxification cellulaire des drogues, toxines et autres composés exogènes. Enfin, il participe à la métabolisation de molécules faisant partie de la thérapie antirétrovirale.

Les principales cibles de l'aldostérone sont les cellules épithéliales situées au niveau des reins, du colon et des glandes salivaires. Elle régule l'absorption ou la réabsorption du sodium ainsi que la rétention du potassium ce qui maintient l'homéostasie cellulaire. Les mécanismes de contrôle du transport des éléments ioniques se font via des régulations transcriptionnelles et traductionnelles de protéines impliquées dans ces voies (Edelman et al., 1963).

L'aldostérone agit comme un minéralocorticoïde dans le système rénine-angiotensine-aldostérone et elle en est le signal endocrine final. Le récepteur par lequel l'hormone agit est un récepteur nucléaire appelé nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2 (NR3C2) ou MR (Figure 18). C'est un récepteur avec une affinité pour les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes. Dans sa conformation intracellulaire, il est inactif, lié à des protéines chaperonnes, et s'active en interagissant avec l'hormone qui diffuse à travers la membrane plasmique. L'interaction ligand/récepteur entraîne la dimérisation du récepteur et la translocation du complexe dans le noyau qui va alors activer ou réprimer la transcription de gènes cellulaires. Cette activation nécessite le recrutement de co-activateurs tels que CBP/P300, les facteurs associés (PCAF) qui sont également requis pour l'activation basale du LTR du VIH. D'autres co-activateurs sont les protéines Steroid Receptor coactivator 1 (SRC1) qui ont une activité histone acétyltransférase pouvant favoriser l'accès au promoteur. Concernant la répression génique, le MR est capable même de manière inactive de lier les molécules Activator protein 1 (AP-1) empêchant leur rôle de facteur de transcription.

Ces protéines sont capables d'activer la transcription de nombreux gènes qui participent à la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose en réponse à des stimuli via des cytokines ou des infections virales. Les protéines activées suite à l'activation du MR par l'aldostérone sont capables de réguler les flux ioniques à la membrane des cellules. Ces protéines sont des pompes sodium et potassium, la chaîne sodium des cellules épithéliales (EnaC) (Masilamani et al., 1999) et la protéine serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) (Chen et al., 1999).

Il existe deux façons différentes pour l'hormone d'induire la signalisation suite à sa liaison au récepteur. La première est une réponse extrêmement rapide, de l'ordre de quelques minutes, que l'on appelle la réponse non génomique (Losel and Wehling, 2003). Cette réponse fait suite à la liaison de l'hormone via un récepteur, qui n'est pas le récepteur MR, se trouvant à la membrane plasmique et pouvant activer différentes voies de signalisation telles que la voie PI3 kinase (phosphoinositide 3-kinase), la voie des MAP kinase (mitogen-activated protein kinase) mais aussi l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) (Shedder et al., 2002). Cette voie permet de stimuler rapidement des transporteurs de sodium et de proton, des pompes sodium/potassium, à la membrane plasmique afin de réguler les échanges ioniques.

La seconde voie de signalisation de l'aldostérone, qui est majoritaire, est la liaison de l'hormone à son récepteur MR à l'intérieur de la cellule. Cette liaison va induire l'activation transcriptionnelle et traductionnelles de protéines essentielles à la régulation minérale (kinase SGK, pompe à sodium et potassium) (Kolla and Litwack, 2000).

3.1.3.1 – Interaction hormone/récepteur

L'activation des gènes indispensables à la régulation de l'action de l'aldostérone se fait par l'intermédiaire de la liaison de l'hormone à son récepteur MR. C'est la première étape de la voie génomique. De manière basale, le récepteur est présent dans le cytoplasme des cellules cibles sous forme inactive, lié à des protéines chaperonnes de type Hsp (heat shock proteins) 70 et 90. Une fois que l'hormone se lie au récepteur, il y a une dimérisation puis l'ensemble est transloqué dans le noyau. Il se lie alors à des éléments de réponse SRE (éléments de réponses aux stéroïdes) situés sur des gènes cibles au niveau de sites spécifiques d'initiation de la transcription. Ce mécanisme est le plus couramment utilisé par l'hormone mais il est possible que l'hormone active son récepteur dimérisé, si celui-ci est déjà fixé au niveau du génome sur les sites d'initiation de la transcription des gènes cibles. Dans cette conformation, le récepteur est lié à des protéines qui régulent son activation. Le récepteur peut être lié à des co-activateurs transcriptionnels donc une fois que l'hormone se fixe, la transcription est activée. Si le récepteur interagit avec des co-répresseurs, la

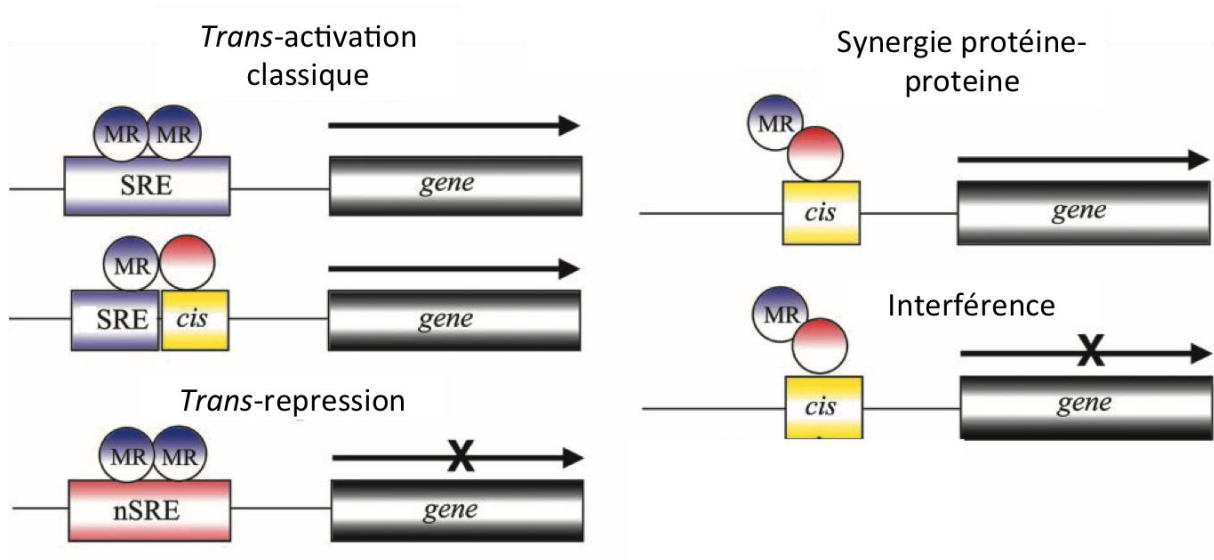


Figure 19 : Représentation schématique de la régulation des gènes par l'aldostérone et son récepteur. Adaptée de (Booth et al., 2002). L'aldostérone agit par l'intermédiaire de sa fixation au récepteur MR et leur interaction sur des éléments de réponse SRE. La liaison sur les éléments SRE permet à la fois d'activer des gènes mais également d'en réprimer certains quand ils se fixent aux éléments nSRE. En plus d'agir en trans, le récepteur et son ligand peuvent agir en cis en se liant à d'autres éléments de réponse que les SRE, afin d'activer ou d'inhiber la transcription de certains gènes.

fixation de l'hormone dépend de l'inactivation de ces protéines inhibitrices et du recrutement de co-activateurs. Ces éléments de réponse SRE sont situés sur des gènes différents, en majorité ceux codant les protéines responsables de la régulation ionique et peuvent avoir différentes fonctions, agonistes ou antagonistes.

3.1.3.2 – Mécanismes d'activation des gènes cibles de l'aldostérone

Il apparaît aujourd'hui que l'aldostérone active autant de gènes qu'elle en réprime pour accomplir sa fonction cellulaire. L'hormone une fois liée à son récepteur va activer différents signaux situés au niveau du génome qui vont activer ou inhiber la transcription des gènes cibles (Figure 19). Les régulations se font soit directement en se liant sur les éléments SRE, soit en partenariat avec des éléments activateurs différents. La liaison du récepteur avec les sites négatifs SRE (nSRE) permet de réprimer la transcription de certains gènes (Robert-Nicoud et al., 2001).

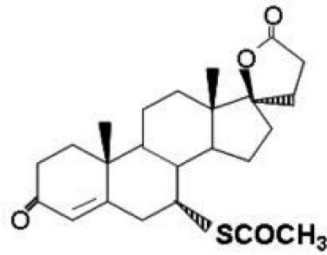
Le second mécanisme de stimulation transcriptionnelle correspond à une liaison indirecte du récepteur MR avec l'ADN et les éléments de réponse qui s'y trouvent. En effet, le récepteur MR est également capable de se lier à des protéines, qui peuvent être des facteurs de transcription, qui sont présentes sur des éléments de réponse différents des SRE. Cette activation en *cis* est aussi bien responsable de l'activation que de la répression de gènes, comme c'est décrit lors de la fixation directe de MR sur les SRE.

Le résultat majoritaire de ces différents mécanismes est la production des protéines ENaC et SGK1 qui vont activer les pompes à sodium, potassium et chlorure (Wagner et al., 2001). L'absorption et la réabsorption de ces minéraux dans le milieu intracellulaire vont entraîner une rétention d'eau. Cette rétention d'eau va avoir pour conséquence une augmentation du volume sanguin, accroissant la pression au niveau des artères.

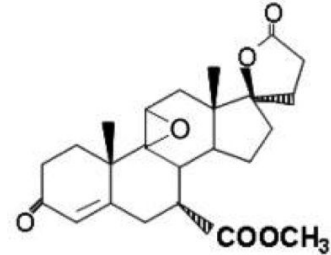
3.1.4 – Les inhibiteurs de l'aldostérone

Les antagonistes de l'aldostérone comme la SP et l'EPL vont être capable de limiter son effet au niveau cellulaire. Cette inhibition compétitive passe par une liaison au niveau des récepteurs MR où habituellement l'hormone se fixe. En venant se lier au récepteur MR, ces antagonistes vont limiter les effets transcriptionnels au niveau des éléments SRE et des protéines agissant en *cis* sur les autres éléments de réponse.

La spironolactone a une structure proche de celle de la progestérone ce qui en fait un inhibiteur non sélectif du récepteur MR mais aussi un inhibiteur des récepteurs aux glucocorticoïdes, à la progestérone et aux androgènes (Greenblatt and Koch-Weser, 1973). L'éplérénone est dérivée de la



Spironolactone



Eplerenone

Spécificité du récepteur comparé à l'aldostérone	MR 0,01	MR 0,005
Effets des métabolites	Oui	Non
Biodisponibilité	80 – 90%	67%
Excrétion	Biliaire et rénale	Rénale et gastro-intestinale
Demi-vie	Spironolactone : 1,4h 7 α -méthylspironolactone : 13,8h Canrenone : 16,5h	4 – 6h

Figure 20 : Résumé des données pharmacologiques entre la spironolactone et l'éplérénone. Adaptée de (Maron and Leopold, 2008). La modification chimique de la spironolactone qui a engendré l'éplérénone a modifié des caractéristiques de la première molécule. La spécificité pour le récepteur de l'aldostérone, la biodisponibilité, la demi-vie, l'effet des métabolites ou encore l'excrétion.

spironolactone par des modifications chimiques faisant de cette molécule un antagoniste spécifique du récepteur MR (de Gasparo et al., 1987). Ces modifications chimiques ont diminué les affinités de cette molécule pour les récepteurs à la progestérone et aux androgènes. Mais cela a aussi modifié différents paramètres comme la spécificité pour le récepteur MR comparé à l'aldostérone (Figure 20). D'autres paramètres pharmacologiques ont été affectés par ce changement de structure telle que la métabolisation et l'existence de métabolites. L'absence de métabolites de l'éplérénone rend cette molécule quasiment sans effets secondaires comparés à la spironolactone (hyperkaliémie et gynécomastie). La biodisponibilité a également été réduite par cette modification mais le temps de demi-vie a lui été augmenté.

L'influence de la spironolactone sur la signalisation de l'aldostérone décrite jusqu'à présent correspond à son rôle sur des cellules épithéliales de différents organes directement impliqués dans les régulations homéostatiques.

3.1.5 – La spironolactone en dehors de la voie de l'aldostérone

Certaines études sont à la base d'une hypothèse selon laquelle la SP pourrait avoir des effets indépendants de sa liaison au MR. Une étude publiée en 2006 par Sønder et ses collaborateurs, montre que la SP intervient dans la modulation de transcrits dans des cellules mononuclées issues du sang (Sønder et al., 2006a). La SP affecte environ un millier de transcrits, dont 80% sont régulés négativement alors que 20% voient leurs transcriptions augmentées. Dans cette étude, il apparaît que les métabolites CAN et 7TS n'affectent pas de gènes et que donc leur action se limiterait à leur rôle d'antagoniste de l'aldostérone.

Les principaux mécanismes cellulaires affectés par la SP indépendamment de sa liaison au MR sont l'apoptose, la voie NF- κ B et la réponse immunitaire (Sønder et al., 2006a). En effet, la SP affecte des gènes impliqués dans la survie cellulaire, qui sont fortement induits après 4 à 6h de traitement avec de fortes doses de drogues. Par contre, les métabolites et l'aldostérone n'ont aucun effet sur l'apoptose.

Le second mécanisme affecté par la SP de manière indépendante de la liaison au récepteur est la voie NF- κ B. La drogue régule négativement le facteur inhibiteur α de la voie, ayant pour conséquence une diminution de l'activité transcriptionnelle du facteur NF- κ B. Etant donné que de nombreux gènes sont sous le contrôle transcriptionnel de ce facteur, de manière indirecte tous ces gènes sont affectés (Sønder et al., 2006b). D'autres facteurs de transcription sont affectés par la SP, tels que myc et les différentes protéines CEBP (CCAAT/enhancer-binding protein), impliquées dans la réponse immunitaire (Sønder et al., 2006a).

La dernière inhibition concerne la régulation des cytokines et chimiokines ainsi que leurs récepteurs (Sønder et al., 2006a; Sønder et al., 2006b). Ces inhibitions affectent négativement les processus immunitaires et inflammatoires des cellules myéloïdes et lymphoïdes. Cela pourrait expliquer les rôles attribués aux antagonistes de l'aldostérone dans l'inflammation.

Certains liens entre la régulation négative des cytokines ou des chimiokines et l'apoptose laisse penser que ces mécanismes se rejoignent par l'intermédiaire de l'action du TNF- α (Mikkelsen et al., 2006) et notamment dans des monocytes traités par de fortes concentrations en SP.

3.1.6 – La spironolactone et les cellules cibles du VIH

L'aldostérone peut être à l'origine de désordre inflammatoire dans différents tissus comme le cœur, les reins et au niveau des vaisseaux drainant ces organes. L'induction du récepteur MR par l'aldostérone induit un stress oxydatif, de l'inflammation vasculaire ainsi que l'expression de biomarqueurs de l'inflammation (Brown, 2008). Ces actions pro-inflammatoires pourraient jouer un rôle dans l'insuffisance cardiaque et rénale induit par l'aldostérone. Il a été montré que l'hypertension induite par l'angiotensine, qui est un précurseur de l'aldostérone dans le système rénine-angiotensine-aldostérone, nécessite la présence de lymphocytes T (Guzik et al., 2007). Il a également été décrit que l'immunité adaptative joue un rôle dans l'hypertension et que durant l'aldostéronisme, excès de production d'aldostérone, les cellules immunitaires sont activées (Ahokas et al., 2005). Durant l'immunité adaptative, les cellules présentatrices d'antigènes modulant les réponses sont les cellules dendritiques (DC). Elles possèdent à leur surface le récepteur MR et peuvent activer les lymphocytes T CD4 et T CD8 naïfs et les différencier en lymphocytes T cytotoxiques mais aussi en cellules T helper (Th). Les maladies inflammatoires et auto-immunes peuvent être induites par des cellules CD4+ caractérisées comme Th17 produisant une cytokine pro-inflammatoire, l'interleukine-17. L'aldostérone peut moduler l'activité des DC qui vont alors activer les lymphocytes CD8+ et induire la polarisation Th17 des cellules CD4+, diminuant également le nombre de lymphocytes T régulateurs. La conséquence de cette induction est la mise en place d'un contexte pro-inflammatoire propice aux maladies induites par l'aldostérone (Herrada et al., 2010). La spironolactone peut limiter la différenciation des cellules T vers un profil pro-inflammatoire Th17 dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et dans la rate empêchant leur polarisation au niveau cardiaque et rénal. Cela limite donc l'hypertension et les pathologies inflammatoires causées par l'aldostérone (Amador et al., 2014).

Les cellules immunitaires sont les cibles naturelles du VIH et en particulier les lymphocytes T qui constituent un réservoir pour le virus quand il ne s'y multiplie pas. La spironolactone limite les

cytokines pro-inflammatoires induites par l'aldostérone et pourrait potentiellement limiter l'infection du VIH. En effet, l'infection promeut la synthèse de ces cytokines pour attirer les cellules immunitaires au lieu de primo infection et pour favoriser sa réplication. Le LTR 5' du VIH possède dans la région U3 des éléments de régulation en réponse à la liaison de glucocorticoïdes et de minéralocorticoïdes (Figure 6). La spironolactone est également capable de dégrader la protéine XPB, indispensable à la transcription par la Pol II utilisée pour la réplication du génome viral. A la vue de ces différents postulats concernant la spironolactone, on peut se demander si elle ne pourrait pas avoir un effet anti-transcriptionnel vis à vis du VIH.

4 – Les molécules antirétrovirales : inhibiteurs du VIH

Les inhibiteurs du VIH sont des molécules antirétrovirales qui principalement bloquent les différentes activités enzymatiques du virus (codées par le gène *pol*). Bloquer les enzymes s'est avéré au fil des années et de la mise au point de la thérapie comme le moyen le plus efficace pour limiter la réplication virale.

Le traitement antirétroviral actuel est composé d'un assemblage de plusieurs molécules qui vont en combinaison les unes avec les autres permettre l'inhibition de différentes étapes du cycle de réplication : la liaison avec le récepteur, la fusion, la transcription inverse, l'intégration et la maturation des virions. Il existe six classes majeures d'inhibiteurs de la multiplication du VIH en fonction de l'étape du cycle viral qu'elles ciblent. Il existe des inhibiteurs de l'entrée et de la fusion virale qui ciblent le récepteur, les corécepteurs et les protéines d'enveloppe du virus. Ensuite, les autres inhibiteurs ciblent uniquement les activités enzymatiques du virus, la transcription inverse, l'intégration et la maturation virale. Afin d'éviter l'apparition et la sélection de mutants résistants aux différentes molécules, les patients infectés par le virus sont soumis à un traitement combinant plusieurs molécules. Ce traitement est appelé thérapie antirétrovirale hautement active (HAART).

Malheureusement, les virus sont capables de s'adapter à la pression de ces molécules. Cela est possible grâce à la transcriptase inverse qui engendre des erreurs, qui est responsable de recombinaison mais également à cause du nombre important de virus produits. Les mutations ainsi acquises sont en grande partie responsable de l'échappement du virus au traitement. Une fois le virus intégré, le traitement permet de maintenir une réplication faible résultant en une charge virale sanguine inférieure à 50 copies/mL et un nombre de lymphocytes T CD4 stabilisé à un taux proche de celui observé avant l'infection. Les molécules limitent la formation de nouveaux virus mais ne sont pas capables de purger les réservoirs viraux déjà présents (Chun et al., 1997).

4.1 – Les inhibiteurs de l'entrée et de la fusion virale

La première étape spécifique du cycle de réplication est l'entrée du virus. Spécifique dans le sens où des protéines virales vont reconnaître des récepteurs et corécepteurs à la surface des cellules. Les principales protéines impliquées dans la fusion et l'entrée virale sont du côté du virus, les protéines gp120 et gp41, et au niveau de la cellule, les récepteurs CD4 et corécepteurs CXCR4 et CCR5.

4.1.1 – Les inhibiteurs de la liaison virus cellule

Les protéines gp120 sont responsables de la reconnaissance du CD4, d'un changement de conformation qui permet un rapprochement du corécepteur et l'exposition de la protéine gp41. La sous-unité gp120 peut alors se fixer au corécepteur pour un attachement optimal du virus à la cellule. Les inhibiteurs vont donc cibler les différentes protéines virales et cellulaires et ainsi bloquer et empêcher leurs interactions (Kuritzkes, 2009). Certaines de ces molécules présentent malheureusement des effets secondaires (Briz et al., 2006).

4.1.1.1 – Inhibiteurs de la liaison virus/CD4

Les premiers inhibiteurs de la liaison du virus à son récepteur ont été développés pour empêcher l'attache du virus à la cellule. Ces inhibiteurs sont donc des formes solubles du récepteur CD4 qui peuvent se lier au virus libre avant qu'il ne se lie aux cellules. Ces récepteurs solubles ont été modifiés afin d'enlever de la protéine sa partie cytoplasmique et transmembranaire, tout en conservant les domaines de liaison à la protéine gp120. Ces molécules ont été synthétisées quelques années après la découverte du virus (Smith et al., 1987) mais elles s'avèrent peu efficaces car rapidement les virus développent des résistances envers ces molécules (Turner et al., 1992).

De nouveaux inhibiteurs ont été synthétisés et ont obtenu des résultats plus prometteurs lors d'essai clinique. Le composé PRO 542, synthétisé quelques années après (Allaway et al., 1995), est une immunoglobuline (IgG) dont les chaînes variables ont été remplacées par les domaines stables et solubles, D1 et D2 de la protéine CD4. Sous forme tétravalente, ce composé a été décrit comme un inhibiteur efficace de la liaison virus/récepteur.

De petites molécules, empêchant la liaison entre l'enveloppe du virus et le récepteur, ont également été testées. Le composé BMS-378806 interagit avec un domaine spécifique de gp120 qui interagit avec le récepteur (Guo et al., 2003). Il a été décrit comme efficace contre le VIH-1 du groupe B, moins contre les autres sous-types et inefficace contre le VIH-2 (Lin et al., 2003).

D'autres molécules peuvent inhiber les étapes immédiatement après cette liaison mais avant la fusion induite par la gp41.

4.1.1.2 – Inhibiteurs de la liaison aux corécepteurs

Ces inhibiteurs sont capables d'empêcher le changement de conformation du récepteur afin de diminuer l'interaction avec le corécepteur. Des anticorps monoclonaux peuvent se lier au récepteur CD4, ce qui diminue sa flexibilité et limite la liaison avec les corécepteurs (Burkly et al., 1992). Ce

composé appelé ibalizumab, montre des effets synergiques quand il est associé avec un inhibiteur de la fusion ou des anticorps dirigés contre la protéine gp120.

Les autres molécules bloquant cette étape post-attachement sont les inhibiteurs qui se lient aux corécepteurs. Il existe majoritairement des récepteurs de CCR5 par rapport à CXCR4 et il a été identifiée une mutation chez certaines personnes qui protège de l'infection virale, CCR5 – $\Delta 32$.

Les principaux inhibiteurs de CCR5 sont des antagonistes qui occupent le récepteur viral, des anticorps monoclonaux ou encore des versions de CCR5 modifiés. Les molécules, qui à ce jour semblent être les plus efficaces sont les antagonistes de CCR5, du moins *in vitro*, car elles ne présentent aucune modification de l'expression de surface de CCR5 et n'ont pas d'effet agoniste. Les principaux composés sont le Maraviroc (Dorr et al., 2005), le Vicriviroc (Strizki et al., 2005) et ont été amenés en essai clinique de phase 3.

Les inhibiteurs du corécepteur CXCR4 sont moins efficaces car la majorité des virus ont un tropisme pour CCR5. Les deux composés testés pour le moment sont AMD3100 (Hendrix et al., 2000) et AMD11070. D'importants effets secondaires sont apparus, laissant supposer le rôle majeur de ce récepteur, particulièrement dans la régulation des cellules myéloïdes dans le sang.

La seconde étape impliquant des protéines virales est la fusion, médiée par la sous-unité gp41 de l'enveloppe virale.

4.1.2 – Les inhibiteurs de la fusion virale

La protéine gp41 suit une dynamique conformationnelle importante pour permettre la fusion du VIH avec la cellule cible. C'est la liaison de la protéine gp120 au récepteur CD4 qui va ensuite entraîner la liaison au corécepteur et permettre le passage d'une conformation non fusogène de la gp41 à un état qui permet ce mécanisme de fusion. Une molécule qui peut bloquer les changements de conformation de la protéine gp41 est l'Enfuvirtide (T-20). C'est un peptide synthétique qui correspond à une région d'interaction de la protéine gp41, bloquant les réarrangements entre ses différents domaines (Wild et al., 1994).

Un autre peptide a été désigné de la même manière que l'enfuvirtide, le T-1249, qui possède également la capacité de bloquer les réarrangements de la protéine gp41 mais qui cible une autre région sur le domaine d'intérêt. Comme la majorité des composés cités précédemment, des variants résistants sont capables de contourner les restrictions induites par les molécules ciblant cette étape.

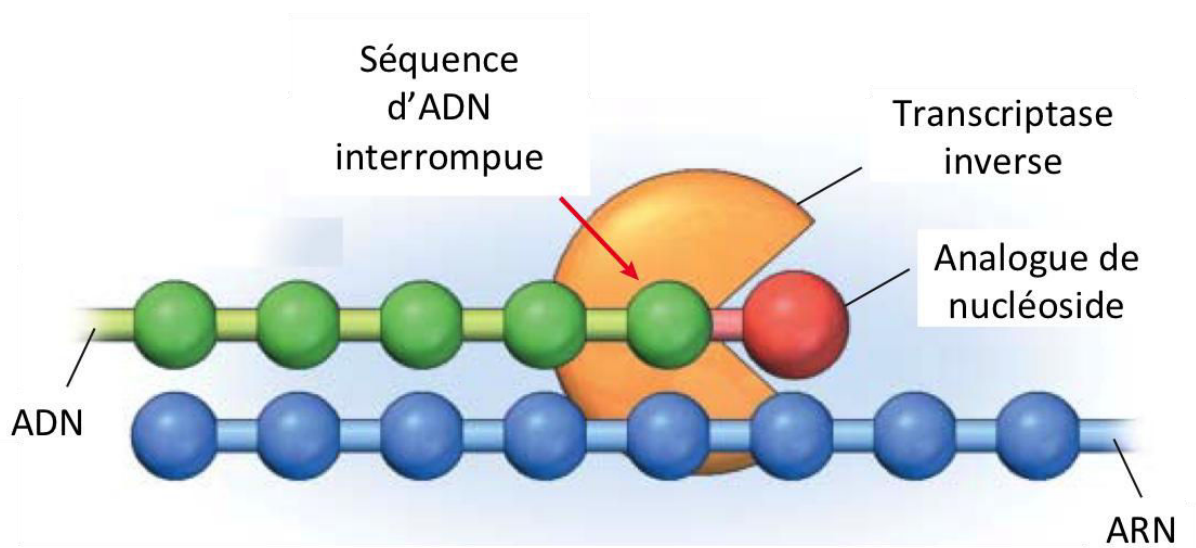


Figure 21 : Schéma du mécanisme d'action des inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH. Adaptée de (Clavel and Hance 2004). *L'analogue de nucléoside peut être incorporé à la place d'un autre nucléoside ce qui entraîne un arrêt de la synthèse de l'ADN viral. La transcriptase inverse est bloquée et incapable de finir la synthèse, il n'y a pas d'ADN viral complet à partir de la matrice viral ARN.*

4.2 – Les inhibiteurs des enzymes virales

La stratégie la plus utilisée pour bloquer la réplication du virus est de cibler les enzymes virales car leur activité est propre au VIH. Très rapidement ces molécules ont été décrites, grâce notamment à l'étude des rétrovirus animaux découverts plusieurs années auparavant. Il existe donc des inhibiteurs de la transcriptase inverse, de l'intégrase et de la protéase.

4.2.1 – Les inhibiteurs de la transcriptase inverse

Les inhibiteurs de la transcription inverse sont divisés en deux classes distinctes, les inhibiteurs nucléosidiques (NRTI) et les non-nucléosidiques (NNRTI). Leur mécanisme d'action est différent mais leur but est de bloquer la transcriptase inverse lors de la multiplication du virus.

4.2.1.1 – Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcription inverse

Ces inhibiteurs sont de structures analogues avec les nucléosides présents dans la cellule et donc vont pouvoir entrer en compétition avec l'incorporation des nucléotides lors de la transcription inverse (Goody et al., 1991) (Figure 21). Il s'agit donc d'une inhibition compétitive avec une modification du substrat de l'enzyme. Leur différence de structure se situe dans l'absence de fonction OH en 3' et se manifeste par l'impossibilité de réaliser les ponts entre les nucléotides. De cette manière, après l'insertion d'un nucléotide modifié, aucun nucléotide ne peut être incorporé dans la séquence, ce qui bloque la synthèse de l'ADN viral. Ces nucléotides ne sont pas un problème pour les polymérases cellulaires qui possèdent une affinité beaucoup plus faible que la transcriptase inverse pour ces nucléotides modifiés. De plus, les enzymes cellulaires possèdent des systèmes de corrections et modifications en cas d'incorporation de tels nucléotides, contrairement à l'enzyme virale, incapable de remplacer une telle incorporation.

Il en existe de nombreux sur le marché actuel et le plus connu est l'azidothymidine (AZT) (Lyerly et al., 1987). Malheureusement, certains virus sont capables de contourner cette inhibition comme c'est le cas pour de nombreuses autres molécules. Une adaptation appelée discrimination, réside dans l'acquisition de mutations de la transcriptase inverse (Krebs et al., 1997; Parikh et al., 2007). Ces mutations causent une diminution de la liaison ou une diminution d'affinité pour l'incorporation du nucléoside modifié afin d'utiliser comme substrat un désoxyribonucléotides non modifié. Le second mécanisme de résistance aux NRTI est appelé excision et favorise l'accès de l'ATP au site de polymérisation. Ce dernier réagit avec le nucléoside modifié et cette réaction va libérer l'analogue de nucléoside de la chaîne d'ADN viral en synthèse.

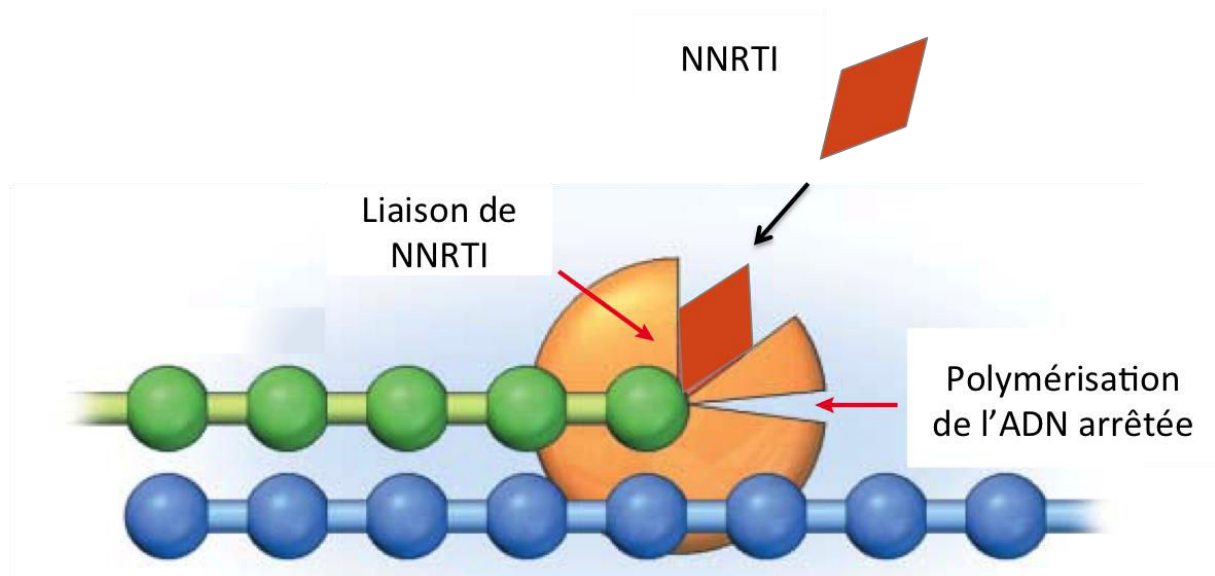


Figure 22 : Schéma du mécanisme d'action des inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcriptase inverse du VIH. Adaptée de (Clavel and Hance 2004). *L'inhibiteur non-nucléosidique se lie au site catalytique de l'enzyme afin de modifier sa structure et ainsi interrompre la synthèse de l'ADN viral (vert) à partir de la matrice ARN (bleu).*

4.2.1.2 – Les inhibiteurs non-nucléosidiques de la transcription inverse

Le mécanisme d'action des inhibiteurs non-nucléosidiques est différent de l'inhibition compétitive décrite pour les inhibiteurs nucléosidiques car ils se lient directement sur le site catalytique de l'enzyme (De Clercq, 1998) (Figure 22). Ils ont été caractérisés à la fin des années 1980 (Baba et al., 1989) et ont montrés des effets inhibiteurs, non-compétitifs, spécifiques au VIH-1 car ils n'avaient aucun effet sur le VIH-2.

Ces inhibiteurs se lient au niveau du site catalytique et bloquent les activités de la polymérase virale, dépendantes de l'ARN et de l'ADN. Ils sont plus spécifiques à la transcriptase inverse que les NRTI et provoquent en général moins d'effets secondaires. Le mécanisme par lequel les NNRTI inhibent la transcriptase inverse n'était pas bien caractérisé jusqu'à ce que Bec et ses collaborateurs mettent en évidence que l'enzyme était plus facilement accessible par les inhibiteurs sous sa forme libre. L'interaction de la transcriptase inverse avec un inhibiteur augmente son affinité pour le génome viral aboutissant à une mauvaise orientation de l'enzyme sur le génome, l'inactivant et l'empêchant d'amorcer la transcription inverse. Dans le cas où l'enzyme serait bien positionnée sur le génome, l'inhibiteur bloque la fixation des nucléosides (Bec et al., 2013). Les inhibiteurs les plus connus sont la névirapine et l'éfavirenz.

L'étape suivante faisant appel à une enzyme virale est l'intégration. L'intégrase du VIH est encapsidée dans la particule virale et fait partie du complexe de pré-intégration qui est importé dans le noyau.

4.2.2 – Les inhibiteurs de l'intégrase

Cette étape permet l'intégration du génome viral au sein du génome cellulaire. Les inhibiteurs de l'intégrase pourraient probablement prévenir les infections virales chroniques. L'intégrase virale n'a aucune enzyme analogue chez l'Homme et de ce fait, cette protéine est une cible de choix pour des molécules antirétrovirales de haute spécificité avec peu de toxicité cellulaire. L'intégration du génome viral se déroule en plusieurs étapes et repose sur deux réactions endonucléasiques (Engelman et al., 1991). Le premier est une coupure dinucléotidique afin de libérer les extrémités 3'-OH de l'ADN viral et la seconde est le transfert du brin pour l'intégration dans le génome cellulaire. Les principaux inhibiteurs de l'intégrase ont une action indirecte sur l'enzyme car ils vont chélater les ions magnésium indispensables à la réaction enzymatique permettant la libération des extrémités 3'-OH. D'autres inhibiteurs ont été développés afin de bloquer le transfert de l'ADN viral vers l'ADN cellulaire, qui est la seconde étape réalisée par l'intégrase.

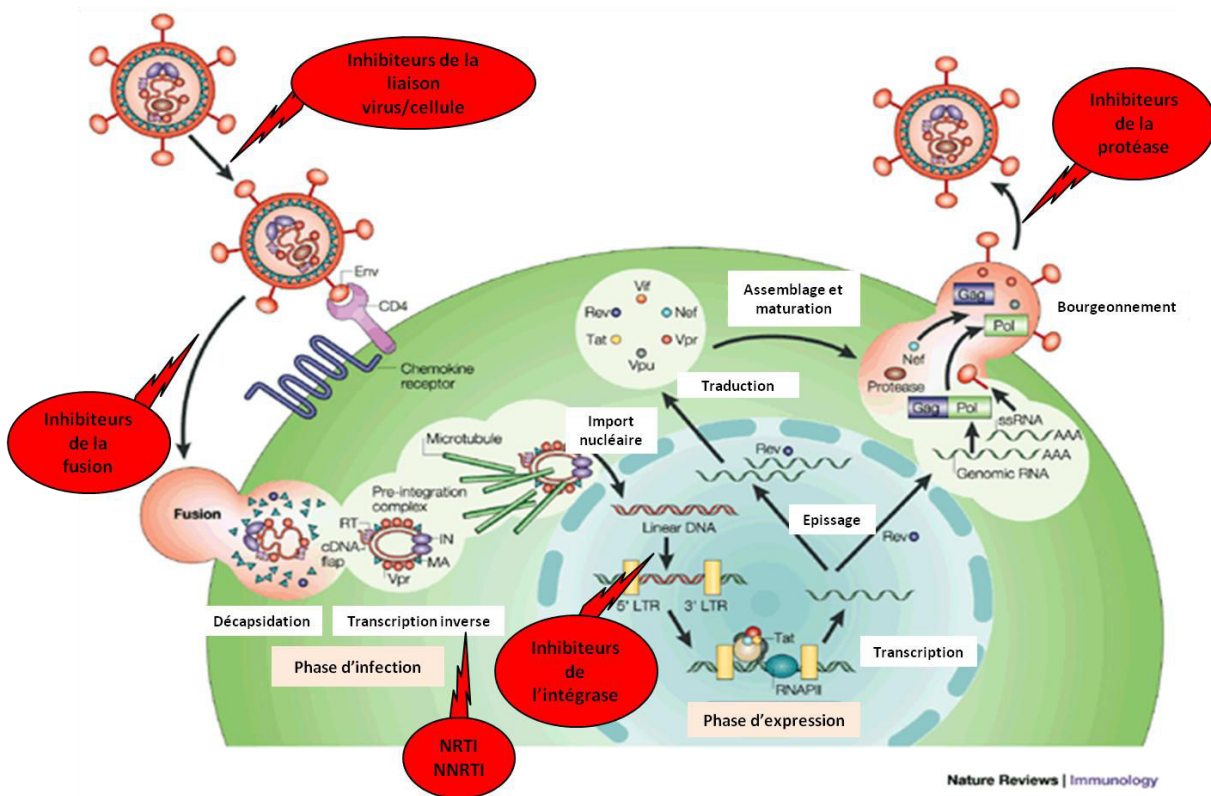


Figure 23 : Les antirétroviraux dans le cycle de réplication virale. Adaptée de (Peterlin and Trono, 2003). Localisation des inhibiteurs thérapeutiques du VIH en fonction des étapes du cycle viral qu'ils ciblent. Les inhibiteurs de CD4, CCR5 et CXCR4 bloquent la reconnaissance du récepteur et la liaison aux corécepteurs. L'inhibition de la gp41 empêche la fusion virale. Les inhibiteurs nucléosidiques et non-nucléosidiques réduisent la transformation de l'ARN viral en ADN double brin. Les inhibiteurs de l'intégrase empêchent la libération des extrémités 3'-OH de l'ADN viral et le transfert du brin dans l'ADN cellulaire. Enfin, les inhibiteurs de la protéase bloquent le clivage protéolytique de gag et empêche la formation de la matrice et de la capside.

Les premiers inhibiteurs de l'intégrase commercialisés datent de l'année 2007 avec la mise sur le marché du raltégravir sous la marque Isentress®. Ces inhibiteurs de l'intégrase sont le résultat du travail initié en 2000 par Hazuda et ses collaborateurs (Hazuda et al., 2000). Les inhibiteurs de l'intégrase ont cependant une limite importante du fait qu'ils ne permettent pas d'éliminer les ADN viraux circulaires (1-LTR et 2-LTR) présents dans le noyau. Ces formes sont importantes car elles peuvent persister dans la cellule. De plus, il a été décrit que les formes circulaires 2-LTR peuvent être à l'origine de nouveaux ADN viraux capables de s'intégrer dans le génome cellulaire (Thierry et al., 2015)

4.2.3 – Les inhibiteurs de la protéase

La protéase virale intervient dans la maturation des particules virales. Son rôle est de cliver les précurseurs gag-pol, qui vont fournir les éléments nécessaires à la formation de la capsidie et les enzymes nécessaires à la réplication virale. Ce processus de clivage est une étape indispensable pour l'infectiosité des virions produits. Les inhibiteurs de la protéase du VIH ou peptidomimétiques, sont pour la majorité d'entre eux des analogues de structure du substrat naturel, la liaison peptidique phénylalanine-proline. Ces inhibiteurs possèdent des séquences en acides aminés modifiés non hydrolysables (Hostetler et al., 1994).

En 1995, le premier inhibiteur de la protéase virale autorisé sur le marché a été le saquinavir (Roberts et al., 1990). Le traitement par des inhibiteurs de protéases se traduit par une diminution durable de l'ARN viral dans le plasma, s'accompagnant d'une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4+. Il existe une grande quantité d'inhibiteurs de protéase mais tous ont une durée de vie relativement courte, une biodisponibilité faible et sont sensibles au cytochrome P450. Il a été mis en évidence que l'utilisation d'un booster tel que le ritonavir, lui-même inhibiteur de la protéase, permettait de ralentir la métabolisation des autres inhibiteurs. Le traitement simultané avec ces 2 molécules permet d'augmenter le temps de demi-vie des molécules et par conséquent leur efficacité (Kempf et al., 1997).

Dans la recherche d'un traitement antirétroviral le plus efficace possible, deux enjeux majeurs subsistent. Le premier est de continuer à inhiber les différentes étapes du cycle viral (Figure 23) mais sans les effets secondaires des molécules actuelles. Le second est de limiter l'adaptation virale qui constitue un frein majeur dans le développement de nouvelles stratégies et de nouvelles molécules. Une nouvelle stratégie pour tenter de limiter la réplication virale est de cibler une protéine, qui n'a pas d'analogue chez l'Homme, directement responsable de la multiplication virale. Cette approche

récemment proposée consiste à cibler la transcription virale, stimulée et amplifiée par l'intermédiaire de la protéine Tat.

4.3 – Les inhibiteurs de la transcription virale

La transcription du VIH est très limitée en absence de l'activateur Tat, qui en lien avec TAR favorise la transcription des messagers viraux. En connaissant l'inefficacité de la transcription basale du promoteur LTR, la recherche d'un inhibiteur bloquant la transcription du VIH s'est intensifiée. Cet inhibiteur pourrait maintenir de façon permanente le génome viral intégré sans qu'il s'exprime. Plusieurs stratégies ont été étudiées : l'inhibition de cofacteurs cellulaires impliqués dans la transcription, la mise en évidence de molécules capables de bloquer l'action de Tat ou alors de s'immiscer entre Tat et TAR afin d'empêcher l'élongation de la transcription. Ces molécules semblent constituer une bonne stratégie car Tat n'a aucun homologue dans les cellules, elle est exprimée de manière précoce et contrôle la synthèse de toutes les autres protéines virales. Mais, étant donné qu'un niveau résiduel de transcription basale peut faiblement activer la transcription du LTR, ces inhibiteurs doivent dans l'idéal être capables d'inhiber la transcription jusqu'à « éteindre » le promoteur. Une latence perpétuelle du provirus serait mise en place que ce soit dans les cellules chroniquement ou nouvellement infectées. Les quelques différences de séquence de Tat entre les différents groupes du VIH-1 mais aussi avec le VIH-2 pourraient cependant constituer une limite importante au développement de telles molécules. Il faudrait donc bloquer sa fonction plutôt que la protéine elle-même, ce qui est la stratégie la plus courante pour les inhibiteurs des enzymes virales. Cela permettrait de mettre en place une cure fonctionnelle du VIH (Mousseau et al., 2015b), bloquant son expression et sa réactivation à partir des réservoirs, mécanisme que les thérapies actuelles sont incapables de contrer.

4.3.1 – Inhibition des cofacteurs de la transcription

Comme le génome viral code peu de protéines, celles qui sont synthétisées sont responsables du détournement de nombreux facteurs cellulaires afin de permettre la réplication du virus. Ces cofacteurs viraux qui sont des éléments cellulaires ont été décrits comme des cibles intéressantes pour des ART (Stevens et al., 2006). Le partenaire transcriptionnel de Tat le plus connu est le complexe P-TEFb, mais étant donné son rôle dans la transcription dans la cellule, il est difficile de trouver un inhibiteur spécifique et non toxique qui permettrait la survie de la cellule.

La première sous-unité du complexe ciblée par de telles molécules a été la protéine CDK9. De nombreux inhibiteurs ont été caractérisés comme bloquant son activité de kinase, mais notamment

le flavopiridol (Chao et al., 2000), des analogues de DRB, le R-roscovitine (Biglione et al., 2007). Malheureusement certains de ces inhibiteurs ont montré des effets secondaires sur les activités enzymatiques d'autres kinases et notamment la protéine CDK2.

La seconde sous-unité du complexe ciblée est la cycline T1, contre laquelle des inhibiteurs ont démontrés leur efficacité. Certains permettent effectivement d'inhiber la formation du complexe entre CDK9 et Tat (Bai et al., 2003; Hoque et al., 2005).

La dernière stratégie pour bloquer la transcription du VIH a été de développer des inhibiteurs d'éléments cellulaires capables d'activer la transcription. Ce sont les éléments NF- κ B, CBP et Sp1. Ces inhibiteurs, qui peuvent être des dérivés de quinoléine, bloquent l'activation basale de la transcription par ces protéines cellulaires (Bedoya et al., 2010). Cependant, leur rôle dans les fonctions cellulaires est très important donc limite l'utilisation de ces inhibiteurs en thérapie antivirale.

4.3.2 – Inhibition l'interaction entre Tat/TAR

L'interaction entre Tat et TAR constitue une spécificité de mécanisme entre des composants qui sont exclusivement viraux. Empêcher ce lien entre ces 2 protéines réduit fortement la production virale. Jusqu'ici peu d'inhibiteurs spécifiques de TAR ont été testés mais le premier décrit est le WM5. Il bloque spécifiquement l'interaction Tat/TAR en se liant à TAR (Cecchetti et al., 2000) et inhibe la transcription à partir du LTR dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). A partir de cette molécule, des dérivés ont été créés avec des activités inhibitrices contre le VIH mais avec un tropisme variable et un mécanisme d'action encore inconnue (Tabarrini et al., 2011). En 2011, un criblage de conformation de molécules se liant à TAR (Stelzer et al., 2011), a également mis en évidence de nouveaux inhibiteurs.

En ce qui concerne le partenaire protéique de ce complexe, Tat, quelques petites molécules ont montré des effets inhibiteurs en ciblant son activité, modifiant sa conformation mais aussi en entraînant sa dégradation (Kalantari et al., 2009; Narayan et al., 2011).

Ces nouvelles molécules, naturelles et synthétiques, telles que la triptolide (TPL) (Wan and Chen, 2014) et la didéhydro-cortistatin A (dCA) (Mousseau et al., 2012) sont apparues comme de nouveaux inhibiteurs efficaces de la réplication du VIH dans les cellules en division mais aussi pour bloquer la réactivation des réservoirs (Mousseau et al., 2015a).

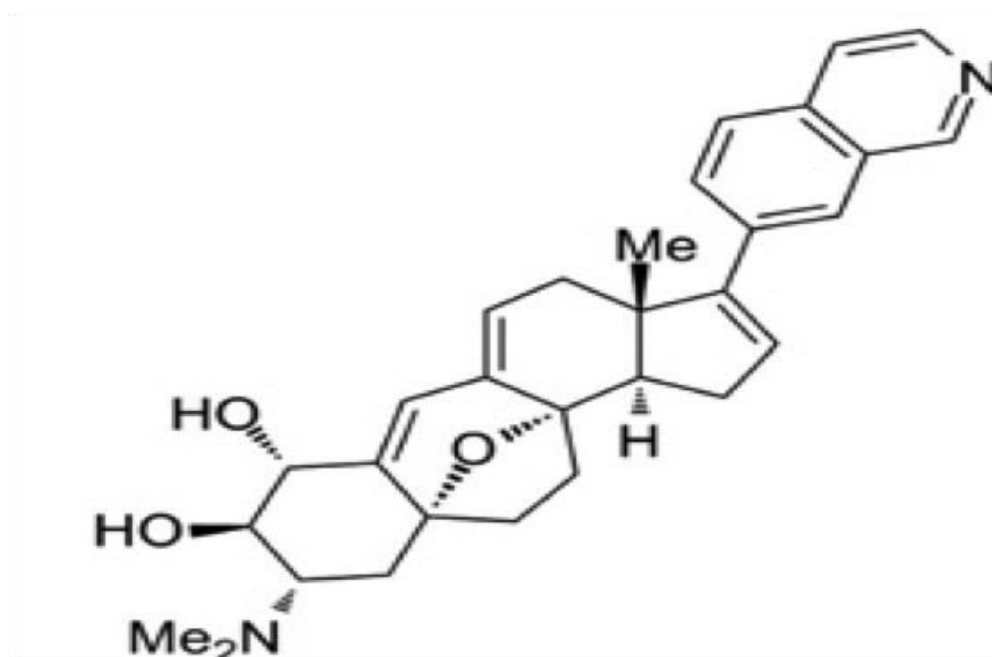


Figure 24 : Représentation de la dCA. (Mousseau et al., 2012). La dCA est un composé issu d'une molécule naturellement présente chez *Corticium simplex*. C'est un analogue stéroïdien de formule chimique $C_{30}H_{34}N_2O_3$.

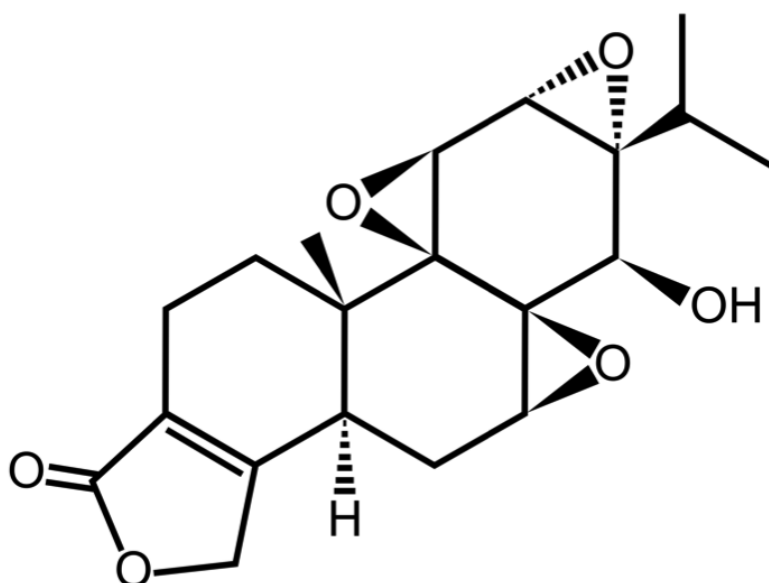


Figure 25 : Représentation de la TPL. (Wan and Chen, 2014). La TPL est un composé naturel issu d'une plante, *Tripterygium wilfordii*. C'est un époxyde diterpénoïde de formule chimique $C_{20}H_{24}O_6$.

4.3.2.1 – La dCA

La dCA est un analogue de composé stéroïdien naturel issu d'une éponge marine (Figure 24). En 2012, Mousseau et ses collaborateurs ont montré que cette molécule était capable d'inhiber la transcription du VIH dépendante de Tat (Mousseau et al., 2012). Plus précisément, à une concentration de l'ordre du nanomolaire, la dCA se lie spécifiquement à Tat sur son domaine de liaison à TAR. Cette fixation inhibe l'initiation et l'élongation de la transcription dépendante de Tat au niveau du LTR du VIH-1 et du VIH-2. Cette inhibition est décrite dans des cellules chroniquement infectées et de novo infectées par le virus.

En 2012, Mousseau et ses collaborateurs ont donc décrit la dCA comme capable de relocaliser Tat en périphérie du nucléole, d'inhiber plusieurs étapes de la transcription et de réduire les ARN messagers viraux. Ces effets sont observés pour des concentrations en dCA plus faibles que les concentrations des inhibiteurs déjà présents sur le marché. L'inconvénient majeur de cette molécule vient du fait que c'est un inhibiteur transcriptionnel dépendant de Tat et donc elle est incapable d'inhiber la transcription basale du LTR entraînant une inhibition maximale moins efficace que des inhibiteurs de transcriptase inverse et d'intégrase. Par contre, la dCA entraîne une extinction plus rapide et irréversible du promoteur LTR. Elle inhibe la réplication virale dans des cellules primaires de patients à différents stades d'infection.

En 2015, Mousseau et ses collaborateurs ont démontré que la dCA réduisait la transcription virale dans différents modèles cellulaires infectés de manière latente. De plus, cette molécule inhibe l'activation de la transcription par Tat et par conséquent diminue fortement la réactivation virale. Pour la première fois, il a été montré que même lorsque la drogue est retirée, l'effet persiste laissant supposer une action irréversible et un blocage épigénétique, une action inédite pour un inhibiteur transcriptionnel. La dCA est également capable d'augmenter l'inhibition de la production et la réactivation à partir de lymphocytes T CD4+ activés chez des patients soumis à un traitement ART (Mousseau et al., 2015a). Cette molécule a les effets nécessaires afin d'envisager une cure fonctionnelle du VIH (Mousseau et al., 2015b).

4.3.2.2 – La triptolide

Cette molécule, extrait de la plante *Tripterygium wilfordii*, a été décrite en 2014 comme un inhibiteur de la protéine Tat (Figure 25). La TPL accélère la dégradation de la protéine Tat de manière spécifique (Wan and Chen, 2014) et il semblerait que la localisation nucléaire de Tat soit une condition requise.

De la même manière que la dCA, la TPL est capable d'inhiber Tat à une concentration de l'ordre du nanomolaire. Cette molécule est testée dans un essai clinique en phase III contre le VIH (NCT02219672). Cet essai sur la molécule est mené sur son effet en combinaison avec un cocktail de molécules antirétrovirales afin d'étudier la taille du réservoir viral chez des patients en phase aiguë d'infection par le VIH-1 traités ou non par la triptolide.

La concentration inhibitrice 50 dans les PBMC se situe aux alentours de 1 nanomolaire alors que le composé présente 50% de toxicité aux alentours de 10 nanomolaires, ce qui limite ainsi son utilisation sous cette forme. En effet, certaines recherches sont menées afin d'obtenir des dérivés de la TPL dont la toxicité serait diminuée.

De manière intéressante, la TPL a également été décrite comme capable d'inhiber l'activité ATPase dépendante de l'ADN de la protéine XPB en s'y liant de manière covalente (Titov et al., 2011). La TPL a aussi été caractérisée comme capable de dégrader l'ARN Pol II (Wang et al., 2011), ce qui induit une inhibition globale de la transcription. Une étude *in vitro* sur l'ADN de cellules traitées par la TPL a montré que la Pol II était en phase de pause. Cette molécule semble donc inhiber l'initiation de la transcription (Chen et al., 2015). Ces effets ont été caractérisés en utilisant des concentrations en TPL de l'ordre du micromolaire. Cette molécule a des effets inhibiteurs de la transcription, virale et cellulaire, à des doses différentes et en ciblant des éléments différents, Pol II ou XPB. Il faut être prudent car les concentrations utilisées dans les lignées cellulaires, pour observer les effets, sont supérieures à la concentration présentant 50% de toxicité dans les PBMC.

Les dernières molécules décrites ici ont des cibles cellulaires et/ou virales, impliquées dans la transcription à partir du LTR 5' du VIH. Les effets observés et les résultats prometteurs laissent supposer que ces nouvelles molécules décrites depuis les années 2010 sont une nouvelle porte pour une extinction spécifique et permanente de la transcription virale. La réplication virale dans des cellules chroniquement et *de novo* infectées, est fortement inhibée après intégration virale. Ces promesses laissent espérer que ces molécules puissent aboutir à une cure fonctionnelle dans des cellules où les virus ne seraient plus capables de se répliquer et se multiplier.

OBJECTIFS

Les cibles du VIH sont les cellules immunitaires et plus particulièrement les lymphocytes, les macrophages et les DC. D'après les éléments controversés de la littérature sur la protéine XPB (Brass et al., 2008; Espeseth et al., 2011; Yoder et al., 2011; Yoder et al., 2006) et les résultats obtenus au laboratoire nous avons décidé de nous concentrer sur le rôle de cette protéine lors de l'infection de lymphocytes T CD4+ par le VIH. En effet, les études précédentes ont montrées des effets d'une mutations de la protéine sur des virus incapables d'effectuer les étapes tardives du cycle de réplication et donc incapables d'infecter de nouvelles cellules. Des cribles par ARN interférent, bien qu'ils soient réalisés avec des virus entièrement réplicatifs, ne montraient en aucun cas le niveau d'inhibition de l'expression de la protéine. Enfin, toutes ces études ont été réalisées dans des systèmes cellulaires qui ne correspondent pas aux cellules cibles de l'infection virale.

Pour cette étude nous avons utilisé la spironolactone, décrite comme molécule dégradant spécifiquement la protéine XPB (Alekseev et al., 2014), pour caractériser le rôle de cette protéine dans l'infection virale des cellules cibles du virus.

Cette étude nous a permis de caractériser pour la première fois, le rôle de la spironolactone sur la réplication du VIH dans les lymphocytes T CD4+. Elle nous a également permis d'effleurer quels sont les mécanismes engagés dans cette inhibition et les liens qu'ils existent entre le trinôme XPB/Tat/LTR.

Finalement, les résultats assemblés par le laboratoire sur le rôle de la protéine XPB et la spironolactone lors de l'infection par le VIH, laissent supposer que cette molécule nécessite une étude plus approfondie afin de connaître plus précisément le mécanisme par lequel elle agit. La protéine XPB semble être un cofacteur de l'infection virale dans les lymphocytes T CD4+ et la spironolactone un inhibiteur spécifique de la transcription du promoteur du VIH. Cette molécule ouvre également de nouvelles perspectives dans l'inhibition spécifique de la réplication virale en ciblant un élément cellulaire, donc limitant l'apparition de variants résistants.

RESULTATS

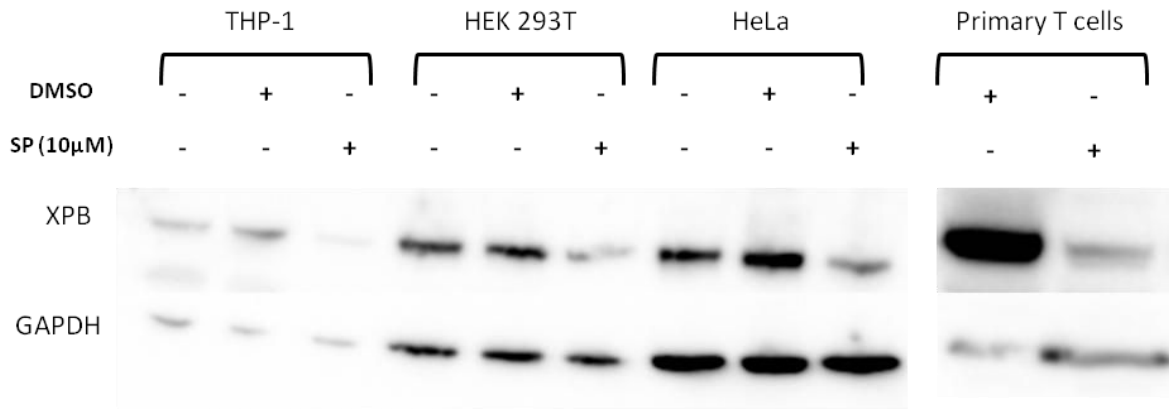


Figure 26 : Effet de la SP sur différentes lignées cellulaires. Les cellules ont été traitées pendant 48h avec la drogue à une concentration de 10 μM. Les cellules ont ensuite été lysées et déposées sur gel SDS-PAGE avant transfert sur une membrane. Cette membrane a été révélée avec des anticorps dirigés contre les protéines XPB et GAPDH.

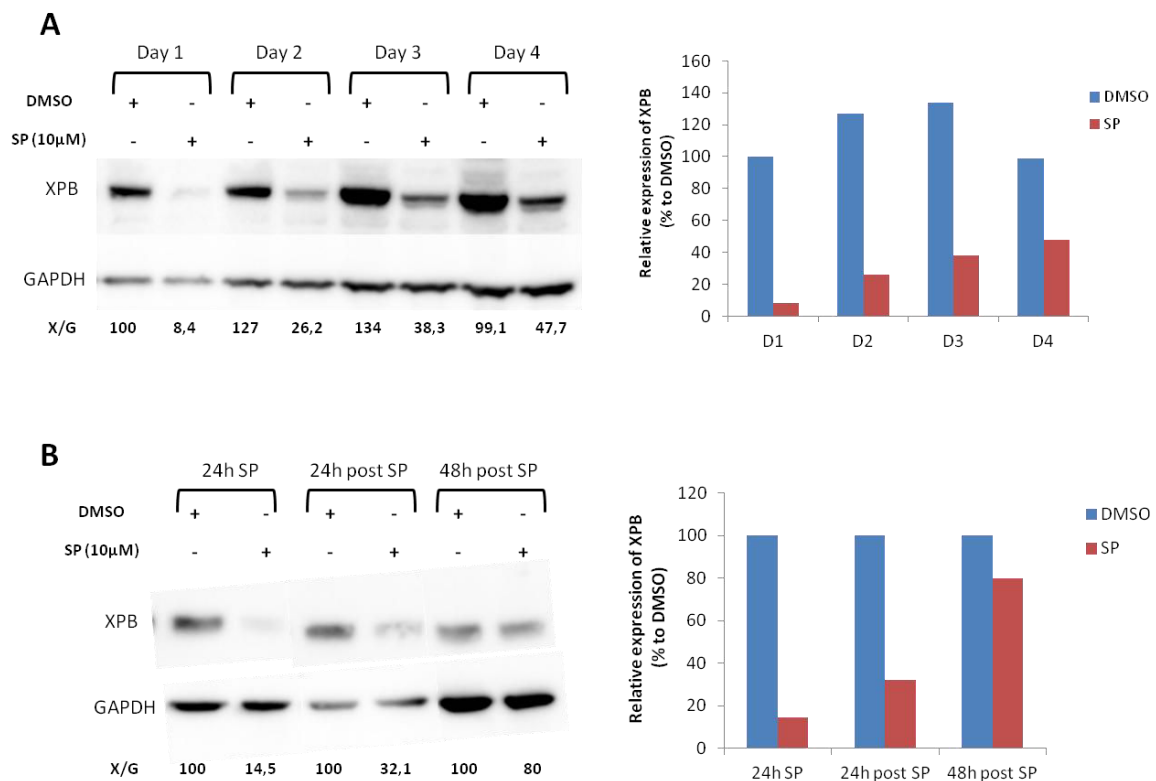


Figure 27 : Effet de la SP sur les cellules Jurkat T. (A) Les cellules ont été traitées pendant 96h avec la drogue à une concentration de 10 μM. Les cellules ont ensuite été lysées et déposées sur gel SDS-PAGE avant transfert sur une membrane. Cette membrane a été révélée avec des anticorps dirigés contre les protéines XPB et GAPDH. (B) Les cellules ont été traitées 24h avec la drogue à une concentration de 10 μM puis lavées et réincubées dans un milieu neuf sans drogue pendant 48h. Les cellules ont ensuite été lysées et déposées sur gel SDS-PAGE avant transfert sur une membrane. Cette membrane a été révélée avec des anticorps dirigés contre les protéines XPB et GAPDH.

1 – Résultats préalables

1.1 – Dégradation de la protéine XPB par la SP

La SP a été décrite en 2014 comme un inhibiteur spécifique de la protéine XPB (Alekseev et al., 2014). Nous avons décidé de profiter de cet outil afin d'étudier le rôle de la protéine XPB dans l'infection par le VIH. Nous avons d'abord vérifié que cette molécule était capable d'induire la dégradation de la protéine XPB dans différents types cellulaires (Figure 26).

Les différentes lignées et les lymphocytes T primaires sont sensibles à la spironolactone. Un traitement de 2 jours avec la SP est responsable d'une dégradation quasi-totale de la protéine dans ces cellules avec un effet moindre dans les cellules HeLa.

Nous avons voulu nous concentrer sur l'effet de la drogue dans les cellules Jurkat T car notre étude s'intéresse au rôle de la protéine XPB dans les lymphocytes T et cette lignée cellulaire est le modèle le plus utilisé au laboratoire.

Dans un premier temps, nous avons traité des cellules Jurkat T avec la SP sans changer le milieu pendant 96h (Figure 27 A). Nous observons que la drogue est efficace dès 24h de traitement avec une diminution d'environ 90% de l'expression de la protéine. Au bout de 48h de traitement avec la SP, l'expression de la protéine XPB est diminuée d'environ 80%, de 70% au bout de 72h et enfin de 50% après 96h. La drogue est consommée dans le milieu lors d'un traitement sur 4 jours et l'expression de la protéine XPB augmente chaque jour.

Dans un second temps, nous avons traité les cellules Jurkat T avec la SP pendant 24h puis nous avons lavé les cellules et remis en culture dans un milieu neuf sans SP (Figure 27 B). Nous observons qu'au bout de 24h de traitement, la diminution de l'expression de la protéine est d'environ 85%, résultats confirmant ceux de la Figure 27 A. 24h après le lavage, l'expression de la protéine est multipliée par 2 pour retour quasi normal 48h après avoir retiré la drogue du milieu.

Pour nos expériences, nous avons donc décidé de d'incuber les cellules pendant une durée maximum de 72h, ce qui nous assure une diminution de l'expression de la protéine XPB d'au moins 70%.

Nous avons ensuite vérifié que la dégradation de la protéine XPB était liée au protéasome dans les cellules Jurkat T, en utilisant un inhibiteur du protéasome 26S, le MG 132.

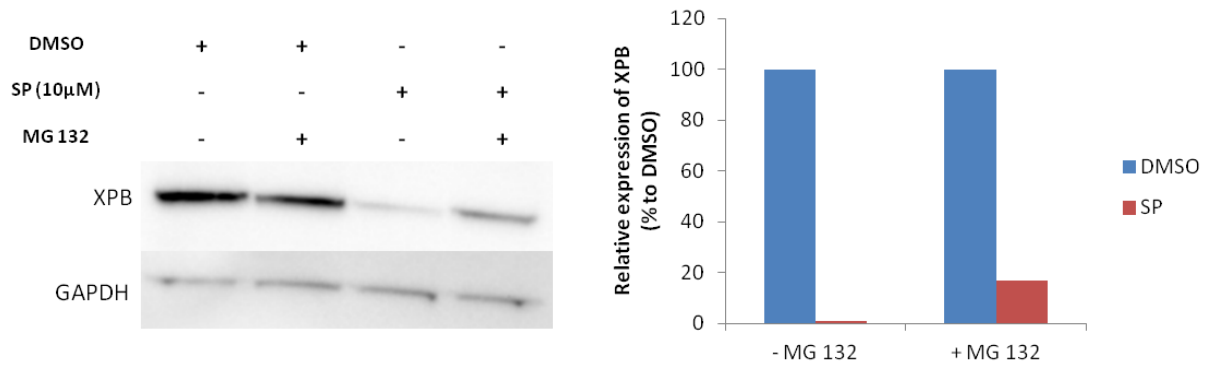


Figure 28 : La dégradation de la protéine XPB est liée au protéasome. Les cellules Jurkat T sont traitées pendant 3h avec la SP avant que le MG132 soit ajouté à une concentration de 10 μ M pendant 2h. Les cellules ont ensuite été lysées et déposées sur gel SDS-PAGE avant transfert sur une membrane. Cette membrane a été révélée avec des anticorps dirigés contre les protéines XPB et GAPDH.

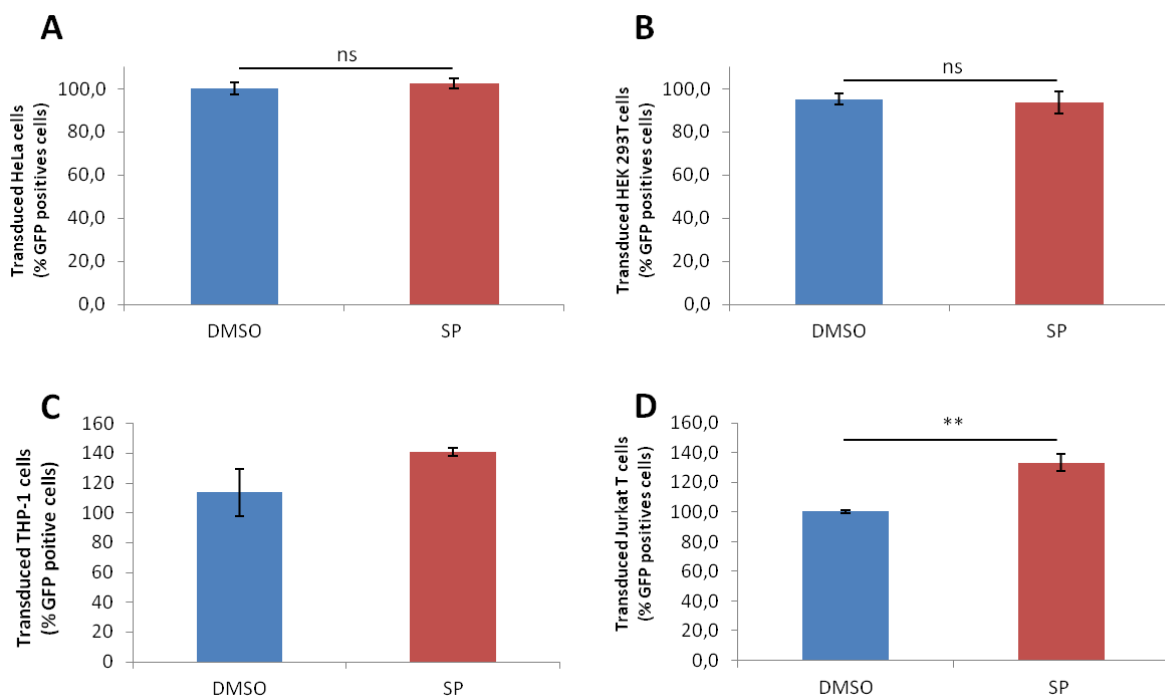


Figure 29 : Effet de la SP sur les cellules transduites avec le pseudovirus HIV-CMV-GFP. (A) Les cellules HeLa ont été transduites par le pseudovirus et incubées avec la drogue, ou le contrôle, pendant 48h à 37°C. (B) Les cellules HEK 293T ont été transduites par le pseudovirus et incubées avec la drogue, ou le contrôle, pendant 48h à 37°C. (C) Les cellules THP-1 ont été transduites par le pseudovirus et incubées avec la drogue, ou le contrôle, pendant 48h à 37°C. (D) Les cellules Jurkat T ont été transduites par le pseudovirus et incubées avec la drogue, ou le contrôle, pendant 48h à 37°C. L'analyse des résultats de transduction se fait par cytométrie en flux, en quantifiant le nombre de cellules GFP +.

On peut observer que le traitement des cellules Jurkat T avec l'inhibiteur du protéasome permet de protéger la protéine XPB de la dégradation (Figure 28). XPB est donc dégradée par la SP par la voie ubiquitine-protéasome. Il est fort probable, qu'en laissant les cellules plus longtemps en présence du MG132, le niveau d'expression de la protéine XPB soit augmenté.

1.2 - Rôle de la SP sur des cellules transduites par un pseudovirus HIV-CMV-GFP

Afin de voir si l'effet de la drogue était comparable à celui de la mutation de la protéine XPB concernant le pseudovirus HIV-CMV-GFP, utilisé par Yoder et ses collaborateurs, nous avons transduit les différents types cellulaires décrits ci-dessus avec ces virus (Figure 29).

Les résultats montrent que la dégradation de la protéine XPB dans les cellules HeLa et HEK 293T ne modifie pas le niveau de transduction par le pseudovirus HIV-CMV-GFP, comparé au contrôle.

La transduction de cellules THP-1 par le pseudovirus qui sont traitées avec la SP montre une légère augmentation du nombre de cellules GFP positives. Quant aux cellules Jurkat T, leur transduction par ce même pseudovirus et le traitement par la SP entraînent une légère augmentation du nombre de cellules GFP positives. Ces résultats sont en accord avec les résultats observés par Yoder et ses collaborateurs avec les virus HIV-CMV-GFP.

1.3 - Rôle de la SP sur des cellules transduites par un pseudovirus HIV-LTR-Luc

Après ces résultats, nous avons testé l'effet de la spironolactone dans ces mêmes cellules mais avec un virus contenant tout le génome viral sauf l'enveloppe qui a été remplacée par le gène de la luciférase (HIV-LTR-Luc). Ces virus sont produits en ajoutant la protéine de l'enveloppe du virus VSV (virus de la stomatite vésiculaire), permettant l'infection de toutes les lignées cellulaires.

Nous avons donc transduit des cellules HeLa, HEK 293T, Jurkat T et primaires CD4+ avec ce virus HIV-LTR-Luc. Les résultats pour les HeLa et les HEK 293T sont résumés dans la figure suivante. Les résultats pour les Jurkat T et les cellules primaires T CD4+ sont représentés dans la Figure 2 Lacombe *et al.*

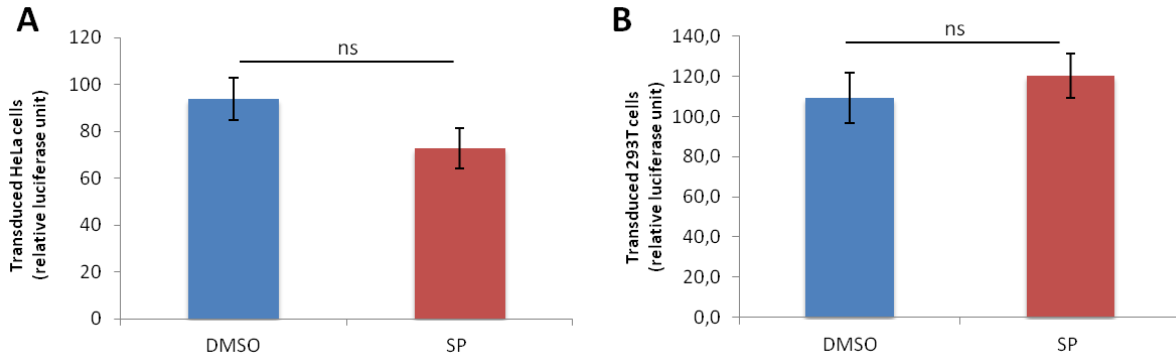


Figure 30 : Effet de la SP sur les cellules transduites avec le virus HIV-LTR-Luc. (A) Les cellules HeLa ont été transduites par le virus HIV-LTR-Luc et incubées avec la drogue, ou le contrôle, pendant 48h à 37°C. (B) Les cellules HEK 293T ont été transduites par le virus HIV-LTR-Luc et incubées avec la drogue, ou le contrôle, pendant 48h à 37°C. L'analyse des résultats se fait par cytométrie en flux en sélectionnant les cellules GFP +, transduites par le virus. L'analyse des résultats se fait par lecture luciférase grâce au kit PROMEGA Luciferase assay, normalisée par un dosage de protéines totales.

Les résultats montrent une légère diminution de la transduction de cellules HeLa en présence de SP mais aucun effet concernant les cellules HEK293T (Figure 30). Les résultats dans les Jurkat T et les cellules primaires T CD4+ dévoilent un effet important de la drogue vis-à-vis de la réplication virale. Nous avons donc décidé de nous concentrer sur les cellules lymphocytaires, cibles naturelles du virus, pour la suite de notre étude.

2 - ETUDE : rôles de la SP et de la protéine XPB dans l'infection des lymphocytes T par le VIH

Le VIH a pour cibles les cellules immunitaires de l'hôte et notamment les lymphocytes T. Dans cette étude, nous avons concentré nos recherches sur les lymphocytes T CD4+, sous forme primaire ou alors de lignée cellulaire. La protéine XPB a été décrite de manière controversée dans la littérature, à la fois comme un facteur inhibiteur mais aussi comme un facteur requis pour l'infection virale. XPB fait partie du complexe TFIIH, impliqué dans la transcription et la réparation de l'ADN. La recherche du rôle de la protéine XPB dans l'infection par le VIH nous a conduits à l'utilisation de la SP. Nous avons caractérisé l'effet de la SP, antagoniste de l'aldostérone utilisé depuis des décennies dans le traitement de l'hypertension, car cette molécule permet la dégradation de la protéine XPB de manière rapide et réversible. Le traitement de cellules Jurkat T ou CD4 primaires par la SP entraîne une dégradation protéique de XPB mais ne modifie pas sa quantité d'ARNm (Figure 1 Lacombe *et al.*). L'expression protéique des autres membres du complexe est peu ou pas affectée par la SP. Le traitement des cellules par l'EPL, n'entraîne pas la dégradation de la protéine XPB (Figure 1 Lacombe *et al.*). D'autres acteurs de la transcription ont été testés, la protéine CDK9 et l'ARN Pol II ne voient pas leur expression diminuée en présence de SP (Figure 1 Lacombe *et al.*). La drogue ne modifie pas la prolifération des cellules Jurkat T comparée au DMSO ou à l'EPL et la viabilité des cellules n'est pas affectée par la SP pour les Jurkat T et CD4 primaires (Figure 1 Lacombe *et al.*).

La dégradation de la protéine XPB dans des Jurkat T transduites avec un pseudovirus HIV-1-CMV-GFP entraîne une légère augmentation de la production de GFP, confirmant les résultats de Yoder et ses collaborateurs, traduisant un rôle certain de la protéine XPB sur le promoteur CMV (Figure 2 Lacombe *et al.*). Les cellules Jurkat T et CD4 primaires, si elles sont transduites avec un pseudovirus HIV-1-LTR-Luc et traitées avec la SP, présentent une réduction d'un facteur 3 de l'infection virale (Figure 2 Lacombe *et al.*). Au contraire, le traitement de cellules Jurkat T transduites par HIV-1-LTR-Luc par l'EPL n'a aucun effet sur l'infection virale. La transduction des cellules n'a pas d'effet sur la dégradation de la protéine XPB en condition SP, suggérant un effet antiviral de la molécule en lien

avec la dégradation de XPB. Des expériences d'inhibition virale dose-dépendante ont permis de déterminer une IC_{50} de la SP de l'ordre de 4 μ M. Les expériences avec un pseudovirus HIV-2-LTR-GFP donne les mêmes résultats pour des Jurkat T transduites et traitées par la SP et l'EPL (Figure S1 Lacombe *et al.*).

Des expériences dans des cellules HeLa montrent qu'il est nécessaire que les cellules soient traitées avec une concentration plus élevée de SP pour obtenir les mêmes taux d'inhibition d'infection virale que ceux dans les Jurkat T. Ces expériences suggèrent une certaine spécificité de cellules et de concentrations de la drogue vis-à-vis du virus. Des expériences de complémentation dans ces mêmes cellules HeLa démontrent qu'une part de l'inhibition observée est due à la protéine XPB car son expression exogène permet de corriger partiellement l'inhibition de l'infection virale (Figure 2 Lacombe *et al.*).

L'infection de cellules Jurkat T par des virus HIV-1 et HIV-2 répliquatifs montre un effet fort de la SP sur la réplication virale avec une diminution de l'infection de l'ordre d'un facteur 4 (Figure 3 Lacombe *et al.*). La SP est capable d'inhiber l'infection, par un virus HIV-1, de cellules Jurkat T *de novo* infectées mais également l'infection de cellules infectées depuis plusieurs jours (Figure 3 Lacombe *et al.*).

L'ensemble de ces résultats et le rôle de la protéine XPB dans la transcription nous ont conduits vers l'hypothèse d'un effet transcriptionnel de la SP. Nous avons étudié l'accumulation des ARN viraux des mini-génomés, exprimant Tat ou non, transduits dans des cellules Jurkat T. Les résultats montrent que la SP est capable d'inhiber la transduction du mini-génome qui code la protéine Tat mais pas celle du mini-génome qui contient la GFP sous le contrôle du LTR (Figure 4 Lacombe *et al.*). L'inhibition de l'accumulation des ARN est le résultat de l'inhibition de la transcription des ARNm à partir du promoteur viral. Dans un système où le promoteur LTR est intégré dans le génome viral, la transfection d'un plasmide exprimant Tat, dans des Jurkat T, entraîne l'augmentation de l'expression des gènes sous le contrôle du LTR en absence de SP. Quand la spironolactone est incubée avec les cellules transfectées, la transcription est complètement inhibée (Figure 4 Lacombe *et al.*). Ces résultats ont été confirmés dans des cellules Jurkat T avec un système exogène, dans lequel le promoteur et Tat sont transfectés. La SP est capable d'inhiber la transcription Tat dépendante à partir du LTR, que le promoteur soit transfecté ou intégré dans la cellule (Figure 4 Lacombe *et al.*).

Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que la protéine XPB est capable d'interagir avec la protéine virale Tat mais qu'en présence de SP cette interaction est perdue. La présence de SP n'empêche pas l'interaction entre Tat et CDK9 (Figure S5 Lacombe *et al.*).

Après avoir démontré que la SP est capable d'inhiber l'infection virale des lymphocytes T, nous avons décidé d'observer les effets de la SP sur des provirus latents. Nous avons utilisé un modèle de Jurkat T possédant un provirus latent dans son génome. L'activation du génome viral par le TNF- α et la PMA entraîne une augmentation de la production de protéines transcrites à partir du LTR. En condition de

SP cette réactivation, qu'elle soit réalisée par l'intermédiaire du TNF- α ou de la PMA, est complètement inhibée (Figure 5 Lacombe *et al.*). Cette étude nous permet d'orienter le rôle de la protéine XPB dans l'infection des lymphocytes T par le VIH comme un facteur nécessaire à la réplication du virus. La spironolactone apparaît donc comme un puissant inhibiteur de la transcription virale dépendante de Tat, dans des cellules produisant des virions mais aussi dans des cellules possédant des provirus latents. Cette molécule ouvre la voie pour la création d'inhibiteurs viraux ciblant des cofacteurs de l'infection virale dans un schéma de cure fonctionnelle.

Specific inhibition of HIV Tat-dependent transcription by spironolactone in T cells

Benoît Lacombe^{1,2,3}, Marina Morel^{1,2,3}, Florence Margottin-Goguet^{1,2,3} and Bertha Cecilia Ramirez^{1,2,3,*}

¹Inserm, U1016, Institut Cochin, 22 rue Méchain, 75014 Paris, France ²CNRS, UMR8104, Paris, France ³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

Tat protein, the HIV transactivator, regulates transcription of the HIV genome by the host transcription machinery. Here, we report that spironolactone (SP), an aldosterone antagonist approved for clinical use, inhibits HIV-1 and HIV-2 infection of permissive infected T cells by blocking viral Tat-dependent transcription from the long terminal repeat (LTR). This inhibition relies on the degradation of the cellular helicase XPB, a component of the transcription factor complex TFIIH. In addition, SP inhibits reactivation of transcription of a latently integrated provirus in T lymphocytes. We further demonstrate that SP's effect on HIV transcription is independent from its aldosterone antagonist function since the structural analogue, eplerenone, does not induce XPB degradation and does not inhibit HIV infection. Therefore, we provide evidence for revisiting the role of XPB as an HIV cofactor. Recently, inhibitors of HIV transcription that target Tat, including dCA and Triptolide have been described. The development of such molecules is important to propose new strategies to inhibit HIV transcription in permissive and latently infected cells in which the virus persists despite antiretroviral therapy.

Transcription | XPB | Spironolactone | HIV | antiviral

Human immunodeficiency viruses type-1 and -2 (HIV-1 and HIV-2) are members of the *Retroviridae* family and are the causative agents of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). The viral RNA of retroviruses is reverse transcribed into double-stranded DNA that is integrated into the cellular chromosome, generating a provirus. Transcription from the provirus promoter in the long terminal repeat (LTR) depends on the combined activity of the host transcription machinery and the HIV transcription activator Tat.

The general transcription factor II human (TFIIH) plays a key role in DNA opening for transcription by RNA polymerase (Pol) II of protein-coding genes, as well as for nucleotide excision repair (1). TFIIH action of opening the DNA helix is required for the transition of initiation to early elongation of Pol II (2). TFIIH is a ten-subunit complex (3), its core is formed by XPB, p62, p52, p44, p34 and trichothiodystrophy A (TTDA). XPD links the core to the CDK-activating kinase (CAK) complex, which is composed of the cyclin-dependent kinase 7 (CDK7), the ménage à trois-1 (MAT1) and cyclin H.

XPB is an ATP-dependent DNA helicase with a 3'-5' polarity (4). During transcription initiation, the ATPase activity of XPB is required for promoter opening and escape (5). TFIIH rotates and threads the dsDNA into the active site cleft of Pol II where upstream DNA at the promoter region is melted by the molecular wrench action of XPB (6). Once XPB allows promoter opening, the CDK7 subunit of TFIIH phosphorylates serine 5 of the heptapeptide repeat of the carboxy-terminal domain (CTD) of Pol II (7). Pol II is paused within 20-40 nucleotides downstream from the transcription start site. Pol II release for productive transcription elongation starts after phosphorylation at serine 2 of the CTD by the human positive transcription elongation factor complex, called P-TEFb. This complex is composed of CDK9 and cyclin T1. It was proposed that XPB ensures that the transition

from initiation to elongation proceeds in an efficient programmed manner by inhibiting CDK9 phosphorylation (8).

The HIV-1 transcription activator Tat is a small protein (86 – 101 amino acids) required for efficient transcription of viral genes (9, 10). Tat binds to the transactivation response element (TAR) present in the nascent viral RNA (11). Tat also transactivates transcription in a TAR-independent manner by stimulating nuclear translocation of NF- κ B (12). Whether Tat stimulates initiation or elongation of transcription has been long debated. Tat interacts with several basal transcription factors at the promoter, it is involved in transcriptional complex assembly and transcription initiation complex stability (13). Tat may play a role in the transition from initiation to elongation by binding directly to the CAK complex of TFIIH (14, 15). The interaction of Tat with the P-TEFb complex (16) and the role of Tat during transcription elongation are well documented (17-19). Tat binding to TAR enhances P-TEFb recruitment and release of paused Pol II at the HIV-1 promoter by activating Pol II CTD phosphorylation.

XPB has been reported both to suppress and to be required for HIV-1 infection. In XPB-deficient fibroblast cell lines, it was postulated that XPB is a defense against retroviral infection (20, 21). XPB was identified as a factor required for HIV-1 in two genome-scale screens in HIV-1-susceptible indicator cells for HIV-1 IIIB and for HXB2 (22, 23). These contradictory data have led us to revisit the role of XPB in HIV infection in relevant target cells for the virus, namely in T cells. To achieve this aim, we focused on the effect of XPB depletion on HIV infection by taking advantage of the property of the aldosterone antagonist spironolactone (SP) to induce rapid and reversible degradation of XPB by the 26S proteasome (24). SP blocks aldosterone activity

Significance

Transcription from the HIV promoter is regulated by the combined activity of the host transcription machinery and the viral transactivator Tat protein. Here, we report that spironolactone (SP) - an antagonist of aldosterone - inhibits HIV-1 and HIV-2 infection of permissive infected T cells and reactivation of HIV-1 latently infected T cells by blocking viral Tat-dependent transcription. This inhibition relies on the degradation of the cellular helicase XPB, a component of the TFIIH transcription factor complex. We provide evidence for revisiting the role of XPB as an HIV cofactor. Our discovery of the HIV inhibitory activity of SP opens the way for the development of novel anti-HIV strategies targeting a cellular cofactor.

Reserved for Publication Footnotes

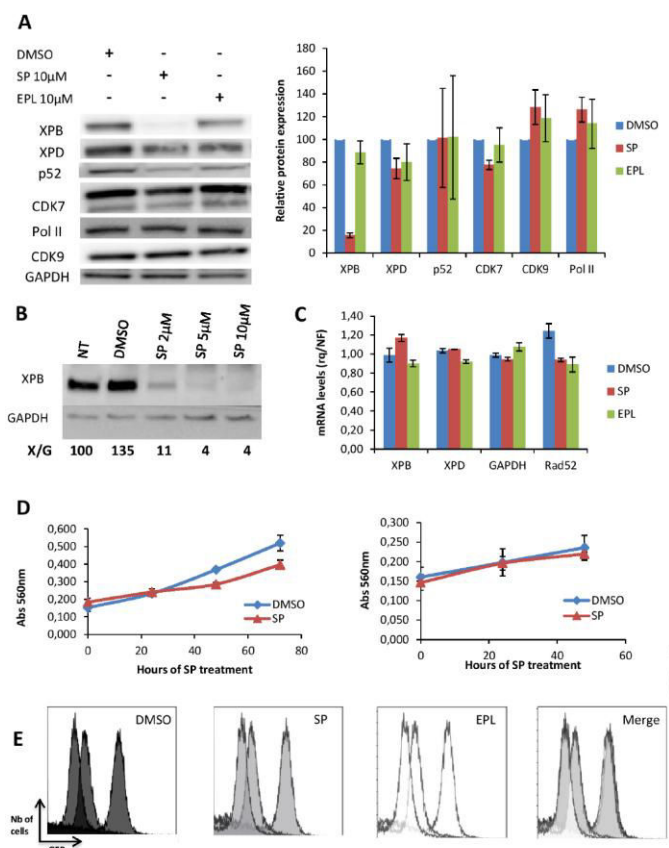


Fig. 1. Spironolactone, but not eplerenone, induces XPB degradation in Jurkat and primary CD4+ T cells without affecting cell viability and proliferation. (A)TFIIH protein levels in Jurkat T cells cultured in the presence of DMSO, SP or EPL during 48 h. Left panel is a representative western blot and right panel is a quantification of four independent experiments. (B) XPB levels in primary CD4+ T cells cultured in the presence of DMSO or of increasing concentrations of SP during 48 h. (C) XPB, XPD, GAPDH and Rad52 mRNA levels in Jurkat T cells after 48h of DMSO, SP and EPL treatments. (D) Viability of Jurkat (left) and primary CD4+ T (right) cells treated with DMSO or SP for up to 3 days using the MTT test. (E) Proliferation of Jurkat T cells treated 3 days with DMSO (black), SP (gray) or EPL (white) was measured by CFSE labeling followed by flow cytometry analysis. Conditions were merged on the last right panel.

by binding to the mineralocorticoid receptor and acting as a receptor antagonist.

Here, we show that SP inhibits HIV-1 and HIV-2 infection of permissive infected T cells by blocking viral Tat-dependent transcription. This inhibition relies on the degradation of XPB. SP also inhibits reactivation of transcription from a latent HIV-1 provirus in latently infected Jurkat T cells. Thus, we provide evidence for revisiting the role of XPB as an HIV cofactor required for HIV infection.

Results

Spironolactone Induces XPB Degradation in Jurkat and Primary CD4+ T cells independently of its mineralocorticoid receptor antagonist activity. Since rapid and reversible proteasome-dependent degradation of XPB induced by SP was reported in HeLa cells (32), we investigated this property of SP in T cells. XPB was completely degraded in Jurkat cells after 10 μM SP treatment (Figure 1A). Other components of the TFIIH complex such as XPD, p52, CDK7 and proteins involved in RNA transcription such as Pol II and CDK9 were not or slightly affected by this treatment (Figure 1A). Contrary to SP, eplerenone (EPL), a compound derived from SP and also an antagonist of aldosterone,

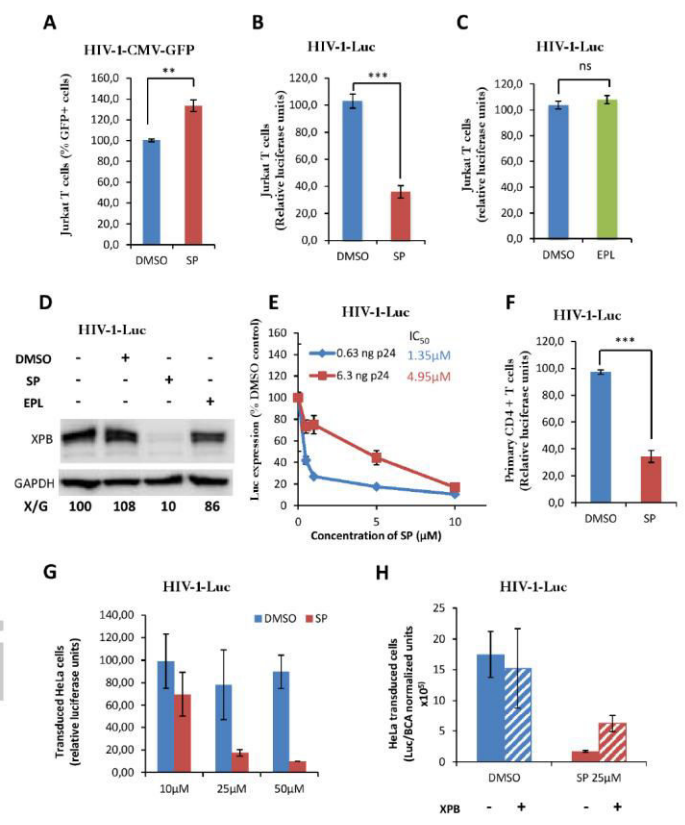


Fig. 2. Spironolactone, but not eplerenone, inhibits HIV-1 transduction. (A) Jurkat T cell transduction with the single cycle HIV-1-CMV-GFP. Cells were cultured or not with SP. The number of GFP+ cells was analyzed by flow cytometry. P= 0.005. **, P<0.01. (B) Jurkat T cell transduction with the pseudotyped single cycle HIV-1-Luc (HIV-1-VSV-G-NL4.3-luciferase-Δenv-Δnef). Cells were cultured or not with SP. P=0.0004. ***, P<0.001. (C) Jurkat T cell transduction with the single cycle HIV-1 Luc. Cells were treated or not with EPL. P= 0.1977. ns = no statistically significant difference. (D) XPB protein level in Jurkat T cells after HIV-1-Luc transduction and cell culture with DMSO, SP or EPL during 48 h. (E) Jurkat T cell transduction with two different amounts of the single cycle HIV-1-Luc. Cells were cultured with increasing concentrations of SP. (F) Primary CD4+ T cell transduction with the single cycle HIV-1 Luc. Cells were treated or not with SP. The results are the mean of experiments with 4 different donors performed in triplicate. P<0.0001. ***, P<0.001. (G) HeLa cell transduction with the single cycle HIV-1-Luc. Cells were treated or not with increasing doses of SP. (H) SP inhibition of HIV transduction is partially restored by addition of exogenous XPB. HeLa cells were transfected with pcDNA3-XPB during 24 h, transduced with HIV-1-Luc and cultured with DMSO or SP during an additional 24 h. Luciferase activity was determined as indicated in Supporting Information. The values were normalized taking as 100% the value obtained for one replicate of control cells treated with DMSO in A, B, C, E and F. The results are the mean of three (in A, C, E, G and H) or four (B) independent experiments performed in triplicate. Errors bars represent standard error of the mean (SEM).

did not induce degradation of XPB (Figure 1A). These results therefore indicate that XPB degradation is independent of the mineralocorticoid receptor antagonist activity of SP. Importantly, in primary CD4+ T cells, XPB was also completely degraded following SP treatment (Figure 1B). XPB and XPD mRNA levels measured by RT-qPCR were unchanged in the presence of SP or EPL (Figure 1C). Similarly, no difference in mRNA levels was observed for other cellular genes such as the GAPDH house-keeping gene or the gene coding for the DNA repair protein Rad52 (Figure 1C). In addition, SP did not affect cell viability measured by using the MTT test in Jurkat or primary CD4+ T cells (Figure 1D) or cell proliferation measured by CFSE labeling (Figure 1E). Altogether these results show that SP treatment of CD4+ Jurkat and primary T cells results in degradation of XPB

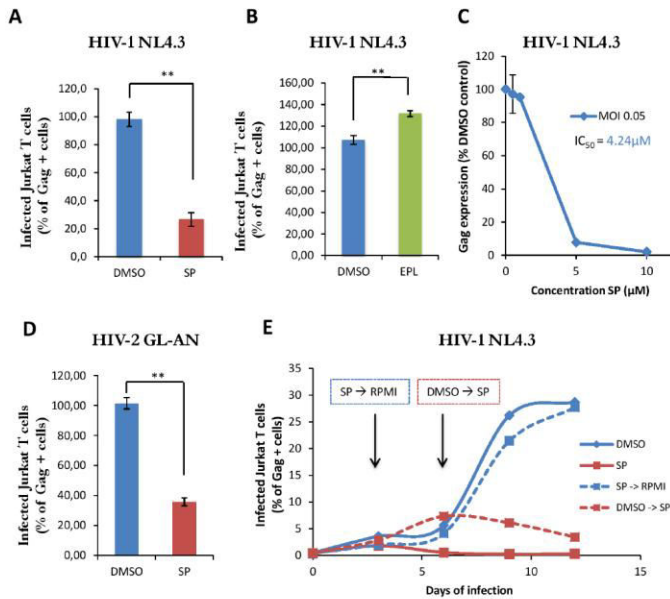


Fig. 3. Spironolactone inhibits HIV-1 and HIV-2 infection of Jurkat T cells. (A) HIV-1 NL4.3 infection of Jurkat T cells treated or not with SP. The number of infected cells was measured by Gag labeling followed by flow cytometry analysis. $P = 0.005$. **, $P < 0.01$. (B) HIV-1 NL4.3 infection of Jurkat T cells treated or not with EPL. $P = 0.0027$. **, $P < 0.01$. (C) Jurkat T cells infection with HIV-1 NL4.3 at a MOI 0.05. SP was added to the culture medium at the concentrations indicated. The number of infected cells was measured by Gag labeling followed by flow cytometry analysis and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined. (D) HIV-2 GL-AN infection of Jurkat T cells treated or not with SP. $P = 0.005$. **, $P < 0.01$. (E) Kinetics of HIV-1 infection in the presence or absence of SP during 12 days. Jurkat T cells were infected with HIV-1 NL4.3 and cultured with DMSO or SP, the medium was changed every 3 days. For some cells at 3 dpi, SP was replaced by RPMI medium without further addition of the drug. For some cells at 6 dpi, DMSO was replaced by SP. The results are the mean of four independent experiments performed in duplicate in A and D and of two independent experiments performed in triplicate in B, C and E. The values were normalized taking as 100% the value obtained for one replicate of control cells treated with DMSO in A, B and C.

without affecting cellular mRNA levels, T cell viability or T cell proliferation.

Spironolactone Inhibits HIV-1 and HIV-2 transduction in Jurkat and primary CD4+ T cells. To confirm in lymphocytes the observation of Yoder *et al.* (20, 21) that XPB is a defense against retroviral infection, we used SP on T cells transduced with the same single cycle HIV-1-CMV-GFP virus as the one they used. This virus leads to CMV-driven GFP expression following integration into the host genome. In agreement with their results, SP treatment led to 30% increase of HIV-1-CMV-GFP transduction in Jurkat T cells (Figure 2A).

Given that XPB belongs to the TFIIH complex, which is involved in the transition from transcription initiation to early elongation, we investigated whether the degradation of XPB induced by SP could affect gene expression under the control of the HIV-1 LTR promoter. For this purpose, a single cycle HIV-1 encoding luciferase directly under the control of the HIV-1 LTR promoter (HIV-1-Luc) was used. Strikingly, in Jurkat T cells, a three-fold reduction of HIV-1 transduction was observed in the presence of SP (Figure 2B), whereas EPL had no effect (Figure 2C). These observations correlated with complete XPB degradation along the two days of transduction in the presence of SP, but not in the presence EPL (Figure 2D). Increasing doses of SP resulted in SP dose-dependent inhibition of HIV-1 transduction; the IC₅₀ of SP for two different amounts of inoculum was 1.4 μM and 5.0 μM (Figure 2E). In addition, a three-fold reduction of HIV-1 transduction was also observed in

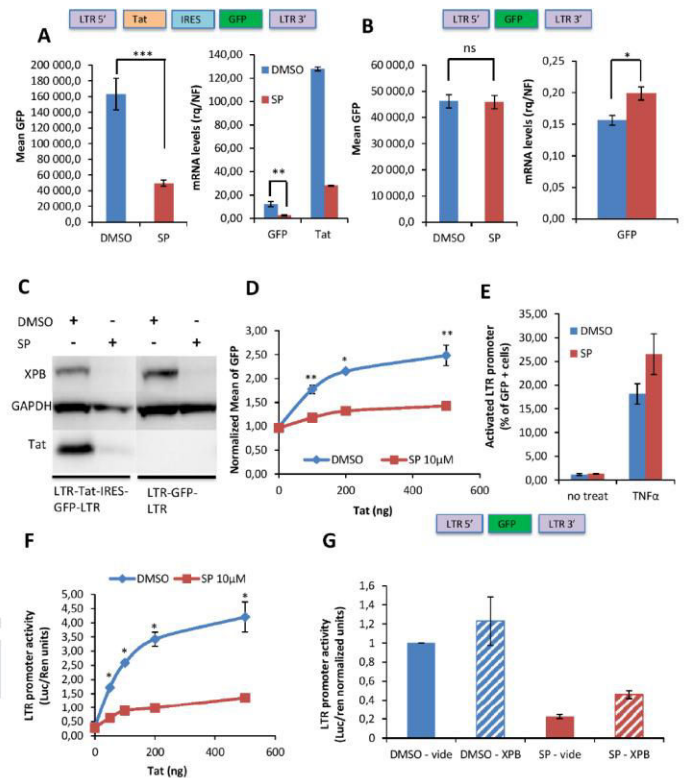


Fig. 4. HIV-1 transcription is inhibited by spironolactone. (A) SP inhibition of transduction with an HIV-1 minigenome encoding for Tat. Jurkat T cells were transduced with the LTR-Tat-IRES-GFP-LTR minigenome, treated or not with SP and analyzed by flow cytometry to determine the mean of GFP fluorescence (left) and by RT-qPCR to determine GFP and Tat mRNA levels (right). (B) SP does not affect transduction with a HIV-1 minigenome lacking Tat. Jurkat T cells were transduced with the HIV-1 LTR-GFP-LTR minigenome, treated with SP and analyzed by flow cytometry to determine the mean of GFP fluorescence (left) and by RT-qPCR to determine GFP and Tat mRNA levels (right). (C) XPB and Tat protein expression in A and B. (D) Tat-mediated activation of transcription of a chromosomal-integrated HIV-1 LTR promoter. Jurkat LTR-GFP cells (JLTRG-R5) were transfected with different concentrations of a plasmid coding for Tat and cultured or not with SP. (E) TNF α activation of transcription of a chromosomal HIV-1 LTR promoter. Jurkat LTR-GFP cells (JLTRG-R5) cells were stimulated with TNF α and cultured or not with SP before analysis by flow cytometry to determine the percentage of GFP+ cells. (F) Tat-mediated activation of transcription of a transfected HIV-1 LTR promoter. Jurkat T cells were co-transfected with plasmids encoding HIV-LTR-Luc, firefly Renilla and Tat. After 24 h of plasmid expression, the cells were treated with DMSO or SP during 24 h. (G) Partial rescue of SP-mediated Tat transactivation inhibition by exogenous XPB. Jurkat T cells were transfected with 4 plasmids encoding HIV-LTR-Luc, firefly Renilla, XPB and Tat. After 24 h of transfection, cells were treated with DMSO or SP for 24 h. The results are the means of three experiments performed in triplicate in A, B, D, E, F and G.

SP-treated primary CD4+ T cells transduced with the same HIV-1-Luc virus (Figure 2F). Therefore, these results indicate that SP inhibition of HIV-1 transduction, as well as the SP-induced degradation of XPB, is independent of SP's mineralocorticoid receptor antagonist activity and that this inhibition is associated with degradation of XPB.

To investigate if SP has an effect on HIV-2 transduction, Jurkat T cells were transduced with single cycle HIV-2 ROD9-GFP followed by treatment with SP. A 30% reduction of HIV-2 transduction was observed under SP treatment (Figure S1 A). As for HIV-1, no significant difference of HIV-2 transduction was observed between EPL-treated Jurkat and control cells (Figure S1 B). Again, XPB was completely degraded in SP-treated Jurkat cells (Figure S1 C). Together these results show that SP inhibits

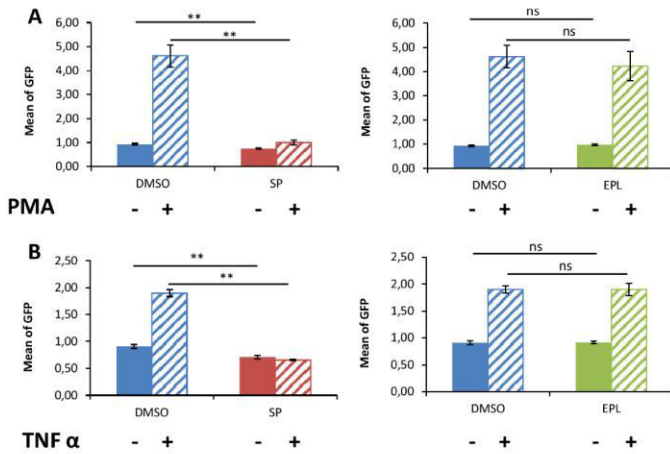


Fig. 5. Spironolactone inhibits HIV transcription reactivation of a latent HIV promoter. (A) Jurkat latent T cells (JLAT A1) were treated with PMA for 2 h following overnight culture with DMSO or SP (left), or DMSO or EPL (right). $P = 0.005$. **, $P < 0.01$. $P = 0.575$, ns = no statistically significant difference. (B) JLAT A1 cells were treated with TNF α for 2 h following overnight treatment with DMSO, SP (left) or DMSO or EPL (right). $P = 0.005$. **, $P < 0.01$. $P = 0.872$, ns = no statistically significant difference. In A and B, the cells were analyzed for the mean of GFP fluorescence by flow cytometry. The values were normalized taking as 100% the value obtained for one replicate of control cells treated with DMSO. In A and B, the results are the means of three experiments performed in triplicate. The values were normalized taking as 100% the value obtained for one replicate of control cells treated with DMSO.

both HIV-1 and HIV-2 transduction in T cells simultaneously with XPB degradation.

Inhibition of HIV-1 transduction by SP relies on XPB degradation. To directly assess the role of XPB, HeLa cells in which XPB DNA can be easily transfected for rescue experiments were used. Higher doses of SP were necessary to reach optimal XPB degradation (Figure S2 A) and to inhibit HIV-1-Luc transduction (Figure 2 G) in HeLa cells than in Jurkat T cells (Figure 2 B). Nonetheless, no change in cell viability measured by using the MTT test was seen at these higher doses (Figure S2 B). Exogenous XPB expression partially restored HIV-1 transduction in SP-treated cells (Figure 2 H). Therefore, the inhibition of HIV-1 infection induced by SP relies, at least partially, on XPB degradation. Together these results support the conclusion that XPB is a cofactor required for HIV infection.

Spironolactone Inhibits Infection of T cells with Replicative HIV-1 and HIV-2. We next analyzed whether SP could inhibit replicative HIV-1 and HIV-2 during multiple rounds of infection. Jurkat T cells infected with the replicative HIV-1 NL4.3 and treated with SP showed at 3 days post infection (dpi) a four-fold reduction of Gag positive cells (Figure 3A) and a seven-fold reduction of the mean of Gag-FITC fluorescence (data not shown). Contrary to SP, no inhibition but rather a small increase of HIV-1 replication was observed with EPL (Figure 3B). SP led to a dose-dependent reduction of HIV-1 infection with an IC₅₀ of 4.2 μ M for a multiplicity of infection (MOI) of 0.05 (Figure 3C). Similarly to HIV-1, SP induced a three-fold inhibition of HIV-2 infection during multiple rounds of virus infection in Jurkat T cells infected with the replicative HIV-2 GL-AN (Figure 3D). Together, the results show that SP-mediated inhibition of HIV-1 and HIV-2 infection is amplified after several rounds of viral multiplication in T cells.

To determine if SP acts after HIV-1 infection is established, we performed kinetics of HIV-1 infection in the presence or absence of SP during 12 days. Jurkat T cells were infected with HIV-1 NL4.3 and cultured with DMSO or SP, the medium was changed every 3 days to maintain XPB depletion. Cells cultured with SP for 12 days showed complete inhibition of HIV-1 replication (Figure

3E, red line). For cells cultured without SP, 7% and 30% of Gag positive cells were obtained at 6 dpi and 12 dpi, respectively (Figure 3E, blue lines). When SP was added to the medium at 6 dpi, the virus stopped replicating (Figure 3E, red dotted line). These results show that SP can act after HIV-1 infection has been established.

Tat-dependent HIV-1 transactivation is inhibited by Spironolactone. Since XPB belongs to the TFIIH complex that is involved in transcription, we investigated whether SP could affect viral RNA transcription. First, we transduced cells with two distinct viruses that differ by the expression of Tat: a HIV-1 LTR-Tat-IRES-GFP virus, encoding Tat under the control of the LTR, and a HIV-1 LTR-GFP virus, which does not express Tat. SP reduced by 4-fold the mean of GFP fluorescence and by 4.5-fold the GFP and Tat mRNA levels following transduction of the Tat-expressing virus (Figure 4A). On the contrary, SP had no effect on the transduction efficiency or GFP mRNA levels of the LTR-GFP virus (Figure 4B). This suggests that basal transcription from the LTR is not affected and that Tat is essential for the ability of SP to inhibit HIV infection. Western blot analysis of total proteins showed that Tat was absent from SP-treated cells transduced with the HIV-1 LTR-Tat-IRES-GFP virus (Figure 4C). This reduction of Tat correlates with the SP-dependent reduction of Tat mRNA levels. In HeLa cells transfected with different amounts of a plasmid encoding for Tat-GFP, XPB was degraded in the presence of SP, but not Tat-GFP (Figure S3). Altogether, these results suggest that the absence of Tat following transduction by the LTR-Tat-IRES-GFP virus in the presence of SP results from the inhibition of LTR transactivation.

To study viral expression from an integrated promoter, we took advantage of a cellular system, in which the HIV-1 LTR is stably integrated into the host genome of Jurkat cells and drives the expression of GFP (Jurkat LTR-GFP cells: JLTRG-R5). Basal and Tat-dependent GFP expression were compared by adding increasing concentrations of Tat in cells treated or not with SP. Basal transcription from the integrated LTR promoter was identical in the presence or absence of SP (Figure 4D, 0 ng of Tat). However, Tat-dependent transactivation was very low in the presence of SP compared to control cells (Figure 4D). In contrast, SP had no effect on TNF α -mediated LTR activation (Figure 4E). These results strongly suggest that the inhibition of HIV-1 infection observed in SP-treated cells is mainly due to inhibition of Tat-dependent HIV-1 LTR transactivation.

To further support this conclusion, Jurkat T cells were transfected with three plasmids, one coding for the HIV-1 LTR promoter driving expression of luciferase, a second for the firefly Renilla luciferase (for normalization) and different concentrations of a third one encoding for HIV-1 Tat. Without Tat, luciferase expression was identical in cells treated or not with SP. Tat efficiently transactivated the LTR in the absence of SP, but not in its presence (Figure 4F). Similar transfection experiments showed that SP had no effect on the CMV and HTLV-1 LTR promoters (Figure S4 A and B), indicating that SP specifically inhibits HIV-1 transcription from its own LTR.

Importantly, exogenous XPB expression partially restored Tat-dependent HIV-1 transactivation in SP-treated Jurkat T cells (Figure 4G), confirming that inhibition by SP relies at least partially on XPB degradation. In agreement with an effect of SP at the level of Tat-dependent transcription, we revealed an interaction between Tat and XPB (Figure S5, right, compare lane 3 to lane 1). This experiment further confirms that SP does not induce Tat degradation in Jurkat T cells (Figure S5, lanes 4). Together these results support the conclusion that SP specifically inhibits Tat-dependent HIV-1 LTR transactivation through XPB degradation in lymphocyte Jurkat T cells.

Reactivation of Latent HIV-1 Transcription is inhibited by Spironolactone. Transcription from a silent integrated HIV-1 pro-

545 moter was studied using Jurkat-derived J-LAT A1 cells that har- 613
546 bor a silent integrated HIV-1 LTR-Tat-IRES-GFP minigenome. 614
547 GFP expression from the latent LTR promoter was compared in 615
548 the presence or absence of SP or EPL after reactivation of tran- 616
549 scription by PMA or TNF α . The measurement of GFP expression 617
550 by flow cytometry is indicative of transcriptional reactivation of 618
551 the repressed HIV genome. PMA increased four times the mean 619
552 of GFP fluorescence in the absence of SP (Figure 5A left), while 620
553 no increase was observed in the presence of SP. No difference was 621
554 observed between cells activated with PMA and then cultivated 622
555 with or without EPL (Figure 5A, right). Similarly, SP inhibited 623
556 reactivation by TNF α while EPL did not (Figure 5B). Identical 624
557 results were obtained when the percentage of GFP-positive cells 625
558 was determined (Figure S6). These results show that SP also 626
559 inhibits reactivation of transcription from a latent promoter. 627

561 Discussion

562 In this study we describe the ability of SP to inhibit HIV-1 and 630
563 HIV-2 infection of T cell lines and primary CD4+ T cells. We pro- 631
564 vide evidence that this inhibition relies on XPB degradation and 632
565 occurs at the level of Tat-dependent transactivation. XPB degra- 633
566 dation is specific of SP and independent from its aldosterone- 634
567 antagonist effect since the derived EPL molecule does not have 635
568 this property. These results design XPB as a cofactor of viral repli- 636
569 cation rather than a host defense factor as previously described 637
570 (21, 25) and highlight a potential interest for SP as an antiviral 638
571 component. 639

572 In Jurkat and primary CD4+ T cells, we observed that SP 640
573 specifically induces the degradation of XPB without cell toxicity 641
574 since and cellular mRNA levels, cell viability or cell proliferation 642
575 were not affected. SP treatment does not affect expression of 643
576 proteins of the transcription machinery such as CDK7, Pol II and 644
577 CDK9. These results are surprising considering that SP targets 645
578 XPB, a central component of the TFIID transcription complex. 646
579 One possibility is that a cellular protein takes the place of XPB 647
580 to carry on its activity in the presence of SP. Another possibility 648
581 is that an undetectable amount of XPB is sufficient to play a 649
582 role within TFIID. As the degradation of XPB induced by SP 650
583 is reversible (24), it could be that XPB is constantly kept at a 651
584 minimal protein level. 652

585 Several lines of evidence support the hypothesis that XPB is 653
586 a cofactor of viral replication: (i) inhibition of HIV transduction, 654
587 replication and Tat-dependent transcription by SP always corre- 655
588 lates with XPB degradation in different systems; (ii) exogenous 656
589 XPB expression partially restores HIV-1 infection from SP inhibi- 657
590 tion both in HeLa and T cells; (iii) XPB is a component of TFIID, 658
591 a transcriptional factor involved in LTR transcription. We show 659
592 here that SP slightly increases HIV-1 transduction of the single 660
593 cycle HIV-1-CMV-GFP virus, in agreement with previous studies 661
594 with this virus (21, 25). These results likely reflect the effect of 662
595 XPB on gene expression from the CMV promoter. However, with 663
596 HIV LTR viruses, as in this study and in previous reports (22, 23), 664
597 the results reflect the role of XPB on LTR-dependent viral gene 665
598 expression and highlight a positive effect of XPB toward the virus. 666
599 In conclusion, the present study provides evidence for revisiting 667
600 the role of XPB as cofactor of HIV-1 and HIV-2 infection of 668
601 natural target cells of the virus and under relevant physiological 669
602 conditions, and definitely refutes the potential antiviral role of 670
603 XPB. 671

604 Nonetheless, we cannot completely rule out the possibility 672
605 that, as a drug, SP may have additional targets than XPB. Global 673
606 methods, such as proteomic Stable isotope labeling with amino 674
607 acids in cell culture (SILAC) may lead to the identification of 675
608 other cellular proteins that could be targeted to the degradation 676
609 pathway under SP treatment. 677

610 Our study shows that basal transcription from the integrated, 678
611 transduced or transfected HIV-1 LTR promoter is identical in the 679
612

613 presence or absence of SP. However, Tat-dependent transcrip- 614
615 tion from the same HIV-1 LTR is very low in SP-treated cells 616
617 compared to control cells. We conclude that the inhibition of 618
619 HIV-1 infection observed in SP-treated cells is due to inhibition 620
621 of Tat-dependent transcription. However, the precise molecular 622
623 mechanism of action of SP on Tat-dependent HIV transcription 624
625 remains to be elucidated. Is SP inhibiting initiation of transcrip- 626
627 tion through XPB degradation? Or is SP also inhibiting Tat- 628
629 dependent elongation of transcription mediated by P-TEFb? Is 630
631 it possible that in absence of XPB and in presence of Tat, P-TEFb 632
633 contributes to the function of TFIID? In line with this, it has been 634
635 reported that Tat modifies the substrate specificity of P-TEFb, 636
637 allowing it to phosphorylate the Pol II CTD both at positions 2 637
638 and 5 (26). Other studies have reported that Tat may bind an 638
639 additional CTD kinase, the Tat-associated T-cell-derived kinase 639
640 (CDK2) that regulates the target-specific phosphorylation of Pol 640
641 II CTD and stimulates Tat-dependent transcription of the HIV- 641
642 1 LTR (27). These findings open several possibilities for a role 642
643 of XPB together with Tat at both initiation and elongation of 643
644 transcription. 644

645 Recently, it was reported that SP has anti-Epstein-Barr virus 645
646 (EBV) activity by inhibiting the function of the EBV protein 646
647 known as SM protein, required for expression of several late lytic 647
648 EBV genes and infectious EBV production (28). The mechanism 648
649 of action of SP in this model remains incompletely characterized. 649
650 Though SP was shown to inhibit RNA accumulation of SM tar- 650
651 gets, XPB levels were not analyzed. It would be very interesting to 651
652 see if in EBV-infected cells SP induces inhibition of SM-activated 652
653 RNA transcription and if this inhibition is associated with XPB 653
654 degradation. 654

655 A long history of more than fifty years of daily use of SP as 655
656 a diuretic, antihypertensive and also inhibitory androgen drug 656
657 confirms that it is not toxic for human cells. SP action does not 657
658 affect normal cells in long-term treatment (29). These results 658
659 highlight the advantage of the use of SP in the treatment of viral 659
660 infections, in particular of EBV and of HIV. 660

661 Triptolide has also been reported to target XPB (30). It is 661
662 a natural product isolated from a traditional Chinese medicinal 662
663 plant with anti-inflammatory, immunosuppressive, contraceptive 663
664 and antitumor activities. Triptolide binds to XPB and inhibits 664
665 RNA Pol II transcription. However, triptolide has been reported 665
666 to promote proteasomal degradation of RNA Pol II (31) and 666
667 Tat (32). Triptolide probably interferes with important cellular 667
668 functions and its clinical potential in its current form is limited 668
669 due to potential safety concerns. 669

670 HIV-1 infection can be suppressed by antiretroviral ther- 670
671 apy but the persistence of latent virus reservoirs limits viral 671
672 eradication. Therefore, infected people must be treated for life 672
673 with antiretroviral therapy. Recently, the Tat inhibitor didehydro- 673
674 cortistatin (dCA) was reported to prevent viral reactivation from 674
675 latent reservoirs, resulting in a permanent state of latency that 675
676 could eventually culminate in a functional cure of AIDS (33). 676
677 Future experiments should aim at examining the possibility that 677
678 SP provides another alternative to inhibit HIV transcription and 678
679 get into a permanent state of latency. 679

680 Materials and Methods

680 **Cell Lines.** Lymphocytic Jurkat T cells (CD4+/CXCR4+, clone 20) were a kind 680
681 gift of Dr. O. Schwartz (Institut Pasteur, Paris, France). The Jurkat clone JLAT 681
682 A1 containing a latent HIV-1 genome was a kind gift of Dr. S. Emiliani (Institut 682
683 Cochin, Paris, France) with the approval of Dr. E. Verdin (34). Jurkat JLTRG- 683
684 R5 cells expressing the HIV LTR promoter and the GFP reporter gene were 684
685 obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS (from Dr. 685
686 O. Kutsch, catalog number 11586). HeLa TZM-bl Reporter cells were obtained 686
687 through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS (from Dr. J. C. 687
688 Kappes, Dr. X. Wu and Tranzyme Inc., catalog number 8129). 688

689 **Cell viability and proliferation.** For viability, MTT (thiazolyl blue tetra- 689
690 zolium bromide; Sigma) assays were performed with 30 000 Jurkat or primary 690
691 CD4 + T cell plated in 96-well flat-bottom plates and cultured in complete 691
692 RPMI medium containing tested drugs (final volume 250 μ l per well). At 692

different time points, 50 μ L of 5 mg/ml MTT solution in PBS (Gibco) were added to each well for 4 h. After removal of the medium, 100 μ L of DMSO were added to each well to dissolve the formazan crystals and the absorbance at 540 nm was determined by using an Infinite F200 PRO plate reader (TECAN).

To assess cell proliferation of Jurkat T, cells were labeled with Cell Trace CFSE cell proliferation kit (Invitrogen) and incubated for 3 days with drugs in RPMI complete medium and analyzed every day by flow cytometry (Accuri C6; BD Biosciences).

Viruses. The NL4.3-Luc Δ env Δ nef plasmid, designated here as HIV-1 Luc, was obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS (from Dr. N. Landau, (35), catalog number 3418). The plasmid HIV-2-ROD9- Δ env Δ nef-GFP (HIV-2 ROD9-GFP) was kindly provided by Dr. N. Manel. The construct coding for HIV-1-CMV-GFP (pRRLSin) was obtained from Dr. A. Cimarelli. The HIV-1 derived vectors HIV-1-LTR-GFP and HIV-1-LTR-Tat-IRES-GFP were kindly provided by Dr. E. Verdin (34). The replicative proviral clone HIV-1-NL4.3 was obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS (from Dr. M. Martin, catalog number 114). The HIV-2 GL-AN proviral clone pGL-AN was kindly provided by Dr. A. Adachi.

Transduction and Infection. Cells were transduced with the single cycle virus (HIV-1-Luc using 0.6 ng of p24 for 500 cells and HIV-2 ROD9 using 0.05 ng of p24 for 500 cells) or the HIV-1 derived vectors (HIV-1-LTR-GFP and HIV-1-LTR-Tat-IRES-GFP, using 1 ng of p24 for 500 cells) or infected with viruses (HIV-1 NL4.3 or HIV-2 GL-AN at an MOI of 0.1) during 3 h at 37°C in complete RPMI medium containing 5 mM Hepes and 2 μ g/ml dextran (Sigma) at the indicated MOI. Cells were then cultured in complete RPMI medium with or without the drugs (SP or EPL at the indicated concentrations) or carrier (DMSO). Percentages of infected cells were determined by Gag labeling in cells infected with NL4.3 and GL-AN viruses by labeling with anti HIV Gag antibody (Kc57-FITC; Beckman Coulter) followed by analysis by flow cytometry (Accuri C6; BD Biosciences). The level of infection was measured by luciferase activity in cells transduced with the HIV-1-Luc by the Luciferase assay system (Promega), following the manufacturer's protocol and luminescence was analyzed with the Infinite F200 PRO plate reader (TECAN). Normalization of Luciferase units was performed using the BCA kit assay (Thermo Fisher) on sample lysates. HIV-1 yield was determined by quantifying p24 levels using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Innotech; Fujirebio).

Additional methods are included in supporting information.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank all members of our "Retrovirus, Quiescence and Proliferation" group for fruitful discussions. We thank Dr. S. Emiliani and Dr. E. Verdin for the gift of Jurkat JLAT A1 cells and the HIV-1 derived vectors, Dr. A. Cimarelli for the HIV-1-CMV-GFP virus and Dr. N. Manel and Dr. A. Adachi for the HIV-2 viruses. We also thank Dr. A.-L. Haenni for editing the manuscript. We thank the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program for kindly providing reagents. We acknowledge the Immuno-biology and the Genome and Sequencing facilities of the Cochin Institute and of Paris Descartes University. This work was supported by grants from the "Fondation pour la Recherche Médicale" (FRM, grant number DEQ20140329528 attributed to FM).

1. Drapkin R, et al. (1994) Dual role of TFIID in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 368(6473):769-772.

2. Dvir A, Conaway RC, & Conaway JW (1997) A role for TFIID in controlling the activity of early RNA polymerase II elongation complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17):9006-9010.

3. Giglia-Mari G, et al. (2004) A new, tenth subunit of TFIID is responsible for the DNA repair syndrome trichothiodystrophy group A. *Nat Genet* 36(7):714-719.

4. Oksenyich V & Coin F (2010) The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell Cycle* 9(1):90-96.

5. Moreland RJ, et al. (1999) A role for the TFIID XPB DNA helicase in promoter escape by RNA polymerase II. *J Biol Chem* 274(32):22127-22130.

6. Fan L, et al. (Conserved XPB Core Structure and Motifs for DNA Unwinding: Implications for Pathway Selection of Transcription or Excision Repair. *Molecular Cell* 22(1):27-37.

7. Lu H, Zawal L, Fisher L, Egly JM, & Reinberg D (1992) Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* 358(6388):641-645.

8. Zhou M, et al. (2001) TFIID Inhibits CDK9 Phosphorylation during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 276(48):44633-44640.

9. Arya S, Guo C, Josephs S, & Wong-Staal F (1985) Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* 229(4708):69-73.

10. Sodroski J, et al. (1985) Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science* 227(4683):171-173.

11. Berkhout B, Silverman R, & Jeang K (1989) Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59:273 - 282.

12. Demarchi F, d'Adda di Fagagna F, Falaschi A, & Giacca M (1996) Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70(7):4427-4437.

13. Brady J & Kashanchi F (2005) Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology* 2(1):1-8.

14. Cujec TP, et al. (1997) The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & Development* 11(20):2645-2657.

15. Garcia-Martinez LF, et al. (1997) Purification of a Tat-associated kinase reveals a TFIID complex that modulates HIV-1 transcription. *The EMBO Journal* 16(10):2836-2850.

16. Herrmann CH & Rice AP (1993) Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase. *Virology* 197(2):601-608.

17. Kao SY, Calman AF, Luciw PA, & Peterlin BM (1987) Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* 330.

18. Marciniak RA & Sharp PA (1991) HIV-1 Tat protein promotes formation of more-processive elongation complexes. *EMBO J* 10(13):4189-4196.

19. Marshall NF & Price DH (1995) Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J Biol Chem* 270(21):12335-12338.

20. Yoder KE, Roddick W, Hoellerbauer P, & Fishel R (2011) XPB mediated retroviral cDNA degradation coincides with entry to the nucleus. *Virology* 410(2):291-298.

21. Yoder K, et al. (2006) The DNA repair genes XPB and XPD defend cells from retroviral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(12):4622-4627.

22. Espeseth A, et al. (2011) siRNA screening of a targeted library of DNA repair factors in HIV infection reveals a role for base excision repair in HIV integration. *PLoS One* 6:e17612.

23. Brass A, et al. (2008) Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319:921 - 926.

24. Alekseev S, et al. (2014) A Small Molecule Screen Identifies an Inhibitor of DNA Repair Inducing the Degradation of TFIID and the Chemosensitization of Tumor Cells to Platinum. *Chemistry & Biology* 21(3):398-407.

25. Yoder K, Roddick W, Hoellerbauer P, & Fishel R (2011) XPB mediated retroviral cDNA degradation coincides with entry to the nucleus. *Virology* 410:291 - 298.

26. Zhou M, et al. (2000) Tat Modifies the Activity of CDK9 To Phosphorylate Serine 5 of the RNA Polymerase II Carboxyl-Terminal Domain during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription. *Molecular and Cellular Biology* 20(14):5077-5086.

27. Nekhai S, Shukla RR, Fernandez A, Kumar A, & Lamb NJ (2000) Cell cycle-dependent stimulation of the HIV-1 promoter by Tat-associated CAK activator. *Virology* 266(2):246-256.

28. Verma D, Thompson J, & Swaminathan S (2016) Spironolactone blocks Epstein-Barr virus production by inhibiting EBV SM protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(13):3609-3614.

29. Mackenzie IS, Macdonald TM, Thompson A, Morant S, & Wei L (2012) Spironolactone and risk of incident breast cancer in women older than 55 years: retrospective, matched cohort study. *BMJ* 345:e4447.

30. Titov DV, et al. (2011) XPB, a subunit of TFIID, is a target of the natural product triptolide. *Nat Chem Biol* 7(3):182-188.

31. Wang Y, Lu J-j, He L, & Yu Q (2011) Triptolide (TPL) Inhibits Global Transcription by Inducing Proteasome-Dependent Degradation of RNA Polymerase II (Pol II). *PLoS ONE* 6(9):e23993.

32. Wan Z & Chen X (2014) Triptolide inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting proteasomal degradation of Tat protein. *Retrovirology* 11(1):88.

33. Mousseau G, et al. (2015) The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *MBio* 6(4):e00465.

34. Jordan A, Defechereux P, & Verdin E (2001) The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J* 20.

35. He J, et al. (1995) Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* 69(11):6705-6711.

Supporting Information

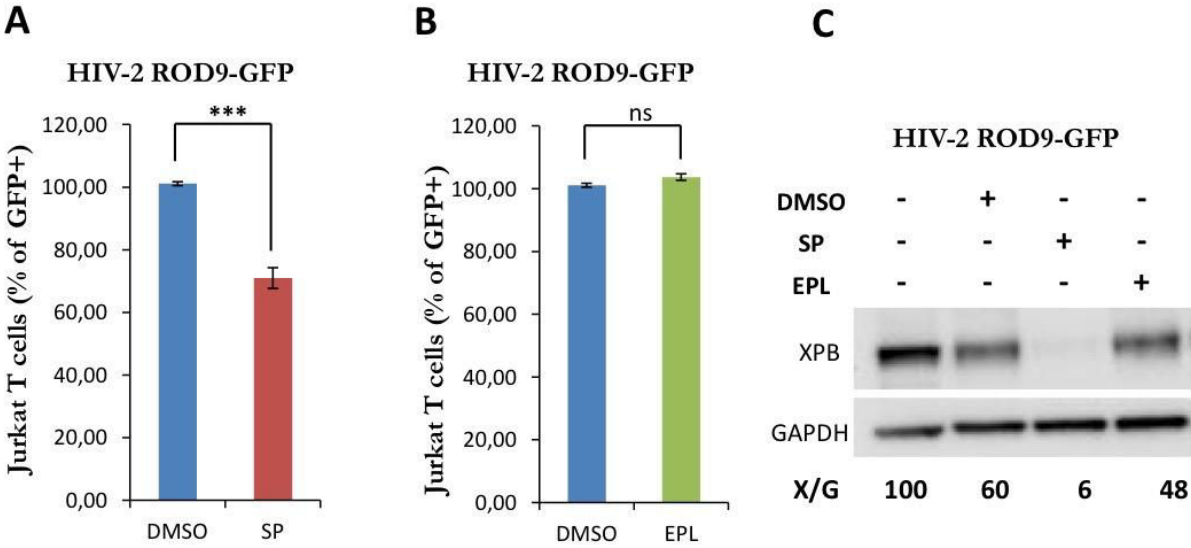


Fig. S1. Spironolactone inhibits HIV-2 replication. (A) Jurkat cells were transduced with the single cycle HIV-2 ROD9 (HIV-2-Rod9-VSV-G-GFP-Δenv), treated or not with SP. The results are the mean of three independent experiments performed in duplicate. P=0.0004. ***, P<0.001. (B) Jurkat T cells were transduced with the single cycle HIV-2 ROD9, treated or not with EPL. The results are the mean of three independent experiments performed in duplicate. P= 0.1977. ns = no statistically significant difference. (C) XPB protein level in Jurkat T cells transduced with the HIV-2 ROD9 and cultured with DMSO, SP or EPL during 48 h. The values were normalized taking as 100% the value obtained for one replicate of control cells treated with DMSO. Error bars represent standard error of the mean (SEM).

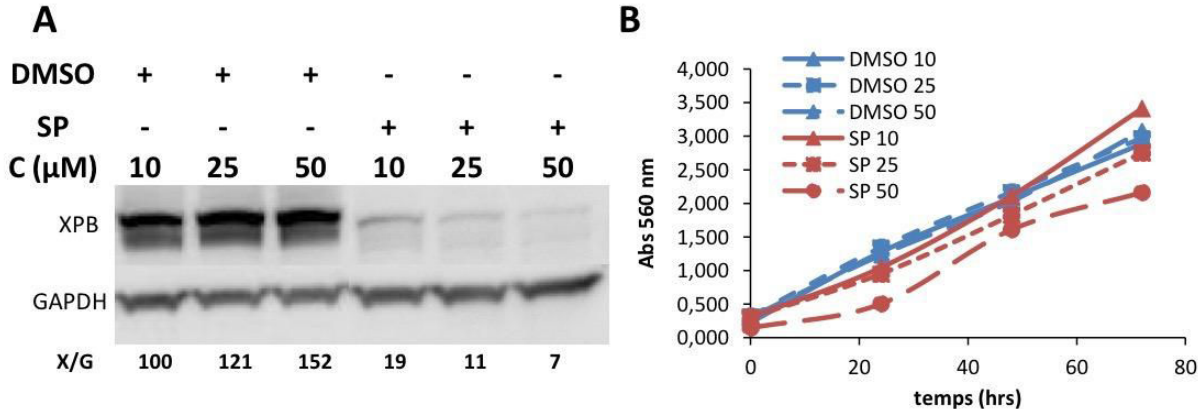


Fig. S2. Spironolactone induces XPB degradation without affecting viability of HeLa cells. (A) XPB protein level in HeLa cells treated with increasing concentrations of DMSO or SP during 48 h. (B) Viability of HeLa cells treated with increasing concentrations of DMSO and SP for up to 3 days using the MTT test.

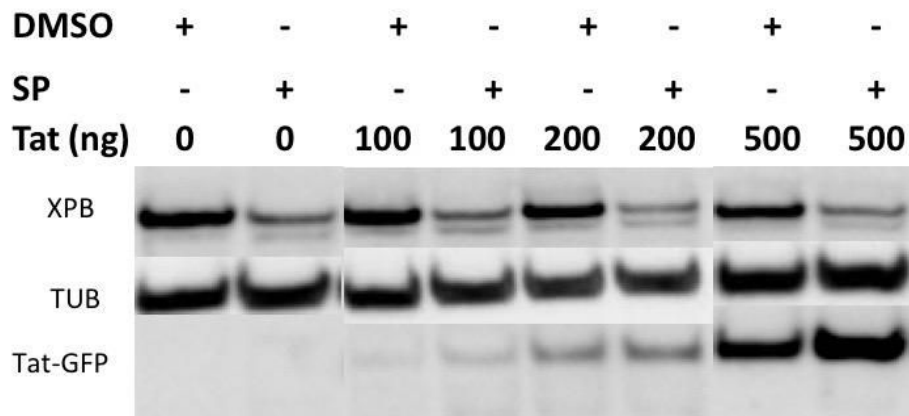


Figure Sup 3. Spironolactone does not induce the Tat protein degradation. XPB and Tat protein levels in cells cultured with DMSO or SP. HeLa cells were transfected with different amounts of a plasmid encoding a Tat-GFP fusion protein and cells were cultured in the presence or absence of SP. Cell extracts were analyzed by western blotting using the indicated antibodies.

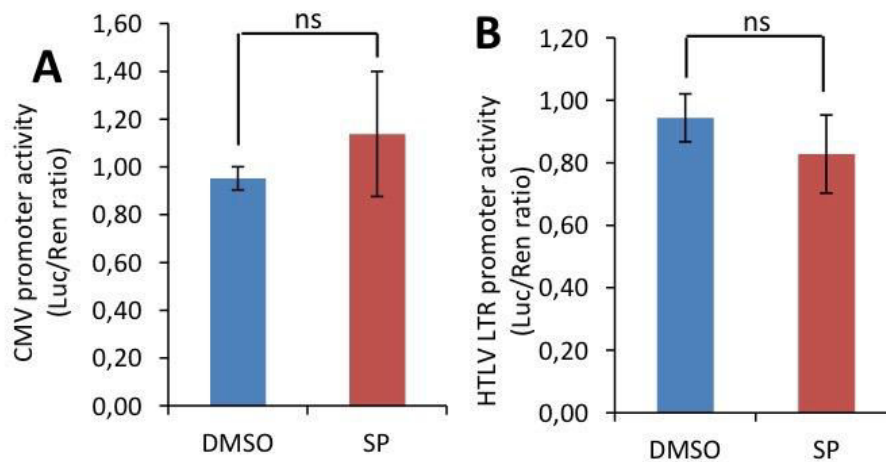


Figure Sup 4. Spironolactone does not inhibit transcription from CMV and HTLV-1 LTR promoters. (A) A plasmid containing an CMV-Luc, a second coding for the firefly Renilla and 100 ng of a plasmid coding for Tat were co-transfected in Jurkat T cells. After 24 h of plasmid expression, the cells were treated with DMSO or SP during 24 h. The results are the mean of three independent experiments performed in triplicate. $P=0.1977$. ns = no statistically significant difference. (B) A plasmid containing an HTLV-LTR-Luc, a second coding for the firefly Renilla and 100 ng of a plasmid coding for Tat were co-transfected in Jurkat T cells. After 24 h of plasmid expression, the cells were treated with DMSO or SP during 24 h. The results are the mean of three independent experiments performed in triplicate. $P=0.1977$. ns = no statistically significant difference.

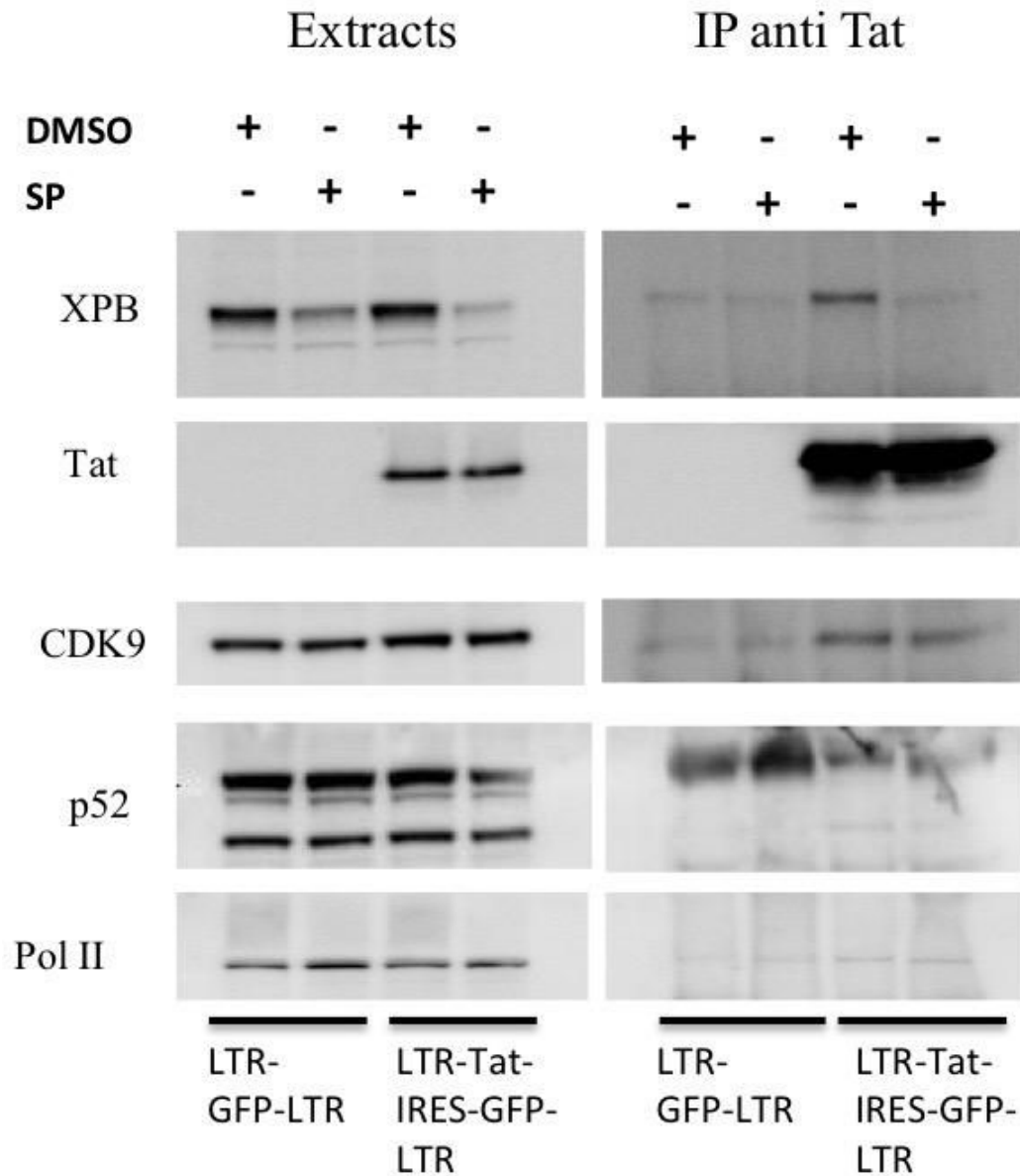


Figure Sup 5. Spironolactone impairs Tat/XPB interaction in Jurkat T-transduced cells. Jurkat T cells transduced with HIV-LTR-GFP-LTR and HIV-LTR-Tat-IRES-GFP-LTR during 72 h and then treated with DMSO or SP for 6 h. Cell extracts were immunoprecipitated using anti-Tat antibodies. Immunoprecipitates (IP) and crude cell extracts were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies.

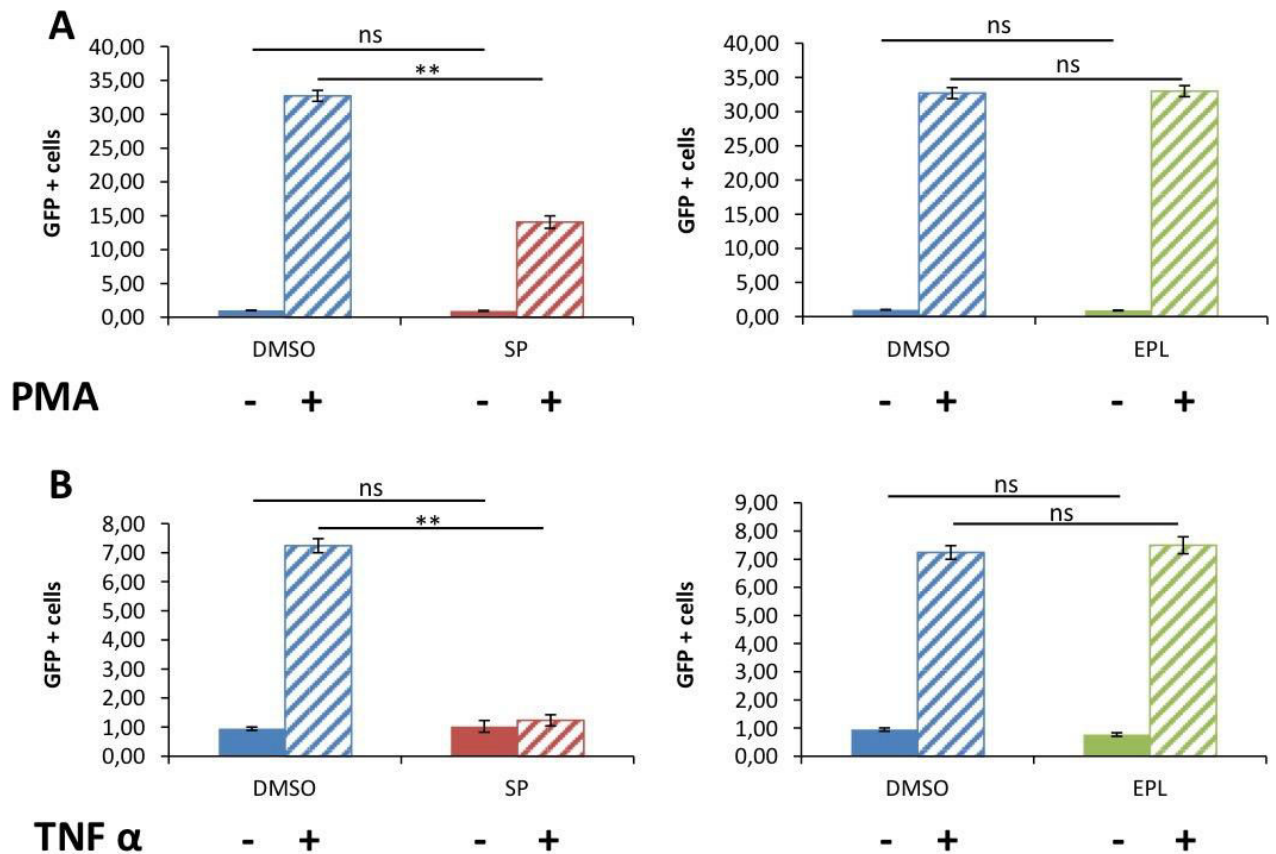


Figure Sup 6. Spironolactone inhibits HIV reactivation from Jurkat latent T cells model. (A) Jurkat latent T cells (JLAT A1) were treated with PMA for 2 h following overnight culture with DMSO or SP (left), or DMSO or EPL (right). $P = 0.005$. **, $P < 0.01$. $P = 0.575$, ns = no statistically significant difference. (B) JLAT A1 cells were treated with TNF α for 2 h following overnight treatment with DMSO or SP (left), or DMSO or EPL (right). $P = 0.005$. **, $P < 0.01$. $P = 0.522$. ns = no statistically significant difference. In A and B, the cells were analyzed for the number of GFP + fluorescence cells by flow cytometry. The values were normalized taking as 100% the value obtained for one replicate of control cells treated with DMSO. In A and B, the results are the means of three experiments performed in triplicate. The values were normalized taking as 100% the value obtained for one replicate of control cells treated with DMSO.

SI Experimental Procedures

Purification and Activation of Primary CD4+ T lymphocytes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the blood of anonymous donors (obtained in accordance with the ethical guidelines of the Institut Cochin, Paris) were isolated by Ficoll (Sigma) density-gradient separation. Primary CD4+ T cells were isolated by positive selection with CD4 magnetic Microbeads (Miltenyi Biotec). The primary CD4+ T cells were activated with Dynabead Human T-activator CD3/CD28 T cell expander (Gibco) and cultured in complete RPMI medium containing interleukin-2 (IL-2; 30 IU/ml; PeproTech) for 3 days prior to infection.

Cell Culture. Jurkat cells were maintained in complete RPMI medium (RPMI-1640 GlutaMAX-I; Gibco), 10 % heat-inactivated FCS (Eurobio) and 1 % antibiotics (penicillin, streptomycin, amphotericin B; Gibco). HeLa cells were maintained in DMEM (Gibco) supplemented with glutamine (Gibco), 10 % heat-inactivated FCS (Biowest) and 1 % antibiotics (as above). The latent HIV-1 promoter of JLAT A1 was activated by PMA (160 nM) or TNF α (1 ng/ml). Spironolactone (SP; Sigma) and Eplerenone (EPL; Sigma) were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma) at 5 mM and then added to the culture medium at 10 μ M.

Virus Production. To produce single cycle pseudo-viruses, plasmids coding for the HIV-1 Luc and for the vesicular stomatitis virus glycoprotein (pVSV-G) were transfected by the calcium-phosphate method in 293T cells. Similarly, to produce HIV-2 ROD9 the cells were transfected with pVSV-G and the plasmid HIV-2-VSV-G-ROD9- Δ env Δ nef-GFP. For production of HIV-1-CMV-GFP, HIV-1-LTR-GFP and HIV-1-LTR-Tat-GFP, cells were transfected with plasmids pVSV-G, psPAX2 (kindly provided by Dr. Nicolas Manel) and with one of the plasmids containing the minimal HIV-1 genomes (CMV-GFP, LTR-GFP or LTR-Tat-IRES-GFP respectively). To produce replicative viruses HIV-1-NL4.3 and HIV-2 GL-AN, proviral plasmids were transfected in the 293T cells. The culture supernatants were collected 48 h and 72 h after transfection and centrifuged at 300 x g. The viral particles were then concentrated in 4 % sucrose gradients (Euromedex) by ultracentrifugation at 100 000 x g for 2 h. Viruses were titrated using the reporter cells TZM-bl.

Analysis of mRNA Levels by Reverse transcription and Real-Time PCR. Total RNA was extracted with the NucleoSpin RNAII kit (Macherey-Nagel, France). cDNA was synthesized with the Maxima first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, France), quantified by real-time PCR with a LightCycler 2.0 (Roche, France) and the primers indicated in supplementary information. The Sybr green technology was employed for amplification of all genes in the following conditions: a first step of denaturation at 95°C for 8 min, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 10 s), annealing (60°C for 10 s), and extension (72°C for 8 s). The second-derivative-maximum method provided by the Light Cycler® 480 SW 1.5 quantification software was used (Roche Diagnostics).

Immunoprecipitation and western blot analysis and antibodies. For immunoprecipitation, 3 x 10⁶ Jurkat cells were transduced with 6 μ g of p24 of the HIV-1 derived vectors HIV-1-LTR-GFP or HIV-1-LTR-Tat-IRES-GFP for three days. They were then treated with SP or DMSO for three hours before protein extraction with RIPA lysis buffer (see below). Extracts were incubated overnight with 2 μ g of anti-Tat antibody (see below) under gentle rocking at 4°C, then protein-G agarose beads (Pierce, Thermo Scientific) were added and incubated for four additional hours before one wash with RIPA, 300 mM NaCl and four with RIPA. Finally, extracts were separated and analyzed by western blot as described below.

Transduced, transfected or infected cells were lysed in adequate volumes of RIPA lysis buffer containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH= 7.5), 2 mM EDTA, 0.5 % NP40, 10 % glycerol and endonuclease (benzonase; Sigma). Protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes, and revealed by chemiluminescence (CDPStarW, Applied Biosystems). Signals were acquired by a LAS 4000 apparatus (Fujifilm) for further analysis using the Multigauge software (Fujifilm). The following antibodies were used: anti XPB (TFIIH p89 S-19; Santa Cruz Biotechnology), anti XPD (TFIIH p80 ab54676; Abcam), anti p52 (TFIIH p52 C-19; Santa Cruz Biotech), anti CDK7 (C-4; Santa Cruz Biotechnology), anti CDK9 (C-20; Santa Cruz Biotechnology), anti Pol II Ser5 (Activ motif), anti GAPDH (6C5; Santa Cruz Biotechnology), anti Tat (02-001; Santa Cruz Biotechnology). All secondary antibodies are coupled with phosphatase-alkaline (Life Technologies).

Transfection for promoter activity. Jurkat T cells or JLTRG-R5 were transfected with DMRIE-C (Life Technologies) in Opti-MEM medium (Gibco). Jurkat cells (300 000) were transfected with 200 ng of plasmid expressing different promoters controlling the luciferase reporter gene. The pGL3 plasmid encodes the CMV-Luc (a kind gift of Dr. Daniel Vaiman, Institut Cochin, Paris, France). The pLTR-Luc plasmid (a kind gift of Dr. Stephane Emiliani, Institut Cochin, Paris, France) encodes the complete HIV-1 long terminal repeat (LTR, nucleotides 1 to 791) driving the luciferase reporter gene. The pHTLV-Luc plasmid encodes the LTR promoter of HTLV-1 driving the Luciferase reporter gene (kindly provided by Dr. C. Pique, Institut Cochin, Paris, France). These plasmids are transfected with different concentrations of the HIV Tat encoding plasmid pEV280 (Obtained through the NIH AIDS Reagent Program, Division of AIDS, from Dr E. Verdin; catalogue number 10453). For normalization, the plasmid pTK-Renilla (kindly provided by Dr. C. Pique, Institut Cochin, Paris, France) was transfected in 1/10 concentration. After 6 h of transfection complete RPMI medium was added and the cells were incubated overnight at 37°C. Next day, complete RPMI medium was supplemented with SP or DMSO for an additional 24 h. The cells were lysed in 100 µL passive lysis buffer (Promega). Dual Luciferase assay system (Promega) was performed for luminescence of Luciferase and Renilla. Data was analyzed with Infinite F200 PRO plate reader (TECAN).

Similarly, 300 000 JLTRG-R5 cells were transfected with 100 ng of the plasmid pEV280 encoding the HIV-1 Tat protein. Cells were cultured as above and after SP or DMSO incubation were fixed in 4% PFA (Electron Microscopy Sciences) and analyzed by flow cytometry (Accuri C6; BD Biosciences).

Oligonucleotide Sequences

Genes	Primers	Sequences (5' - 3')
GFP	F (453)	CTATATCATGGCCGACAAGC
	R (561)	GGTGTTCCTGCTGGTAGTGGT
GFP	F (344)	TCGAGGGCGACACCCCTG
	R (717)	CTTGTACAGCTCGTCCATGC
Tat	F (32)	GGAAGCATCCAGGAAGTCAG
	R (175)	GAGCTCTTCGTCGCTGTCTC
XPB	F (692)	CCACTTCCCGAGTGACAGAT
	R (1036)	GTCACACCAACCAGGGACTT
XPD	F (100)	TACCCCGAGCAGTTCTCCTA
	R (263)	CTGGCACAGTTCTTIGAGCAG
Rad52	F (352)	GAGTACCAGGCCATCCAGAA
	R (485)	CCCAGCCATTGTAACCAAAC
EEF1G	F	AGATGGCCCAGTTTGATGCTAA
	R	GCTTCTCTTCCCGTGAACCCCT
HPRT	F	TGACACTGGCAAAAACAATGCA
	R	GGTCCTTTTTACCAGCAAGCT

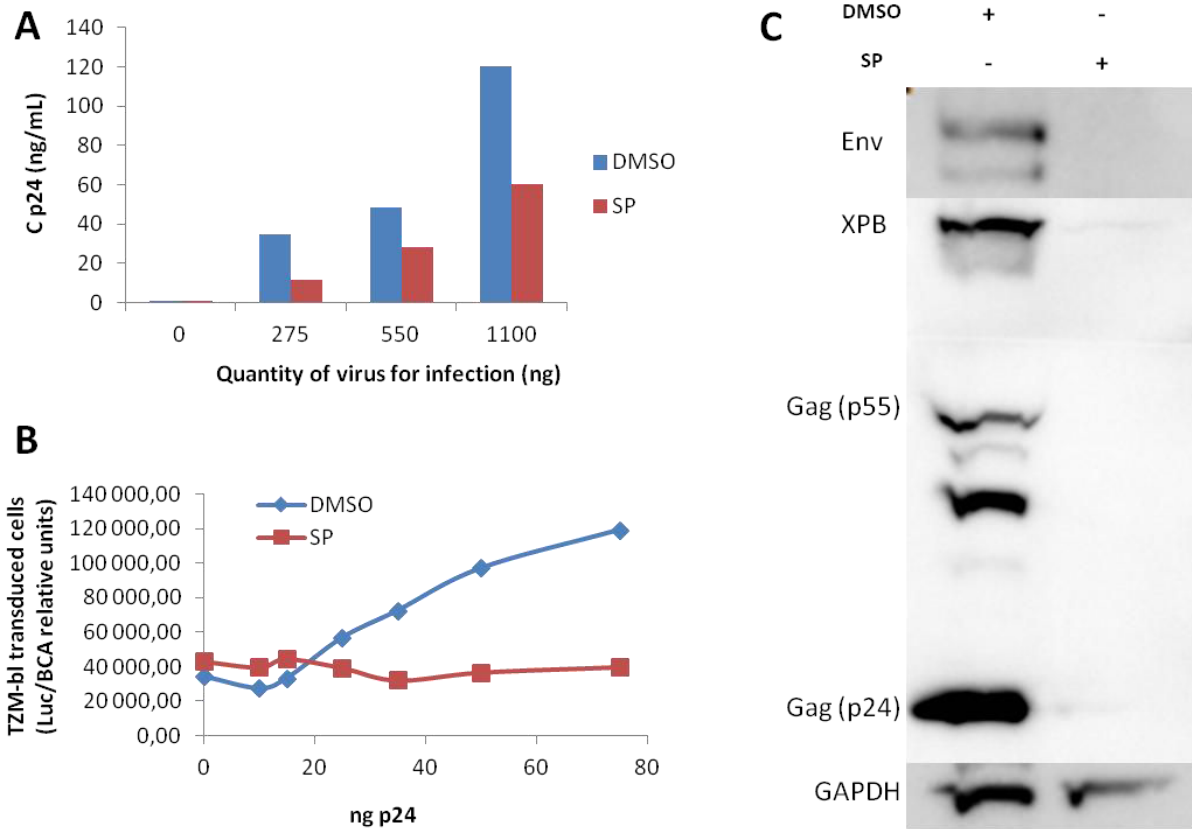


Figure 31 : Effet de la SP sur la production virale et l'infectiosité. (A) Les surnageants de cellules Jurkat infectées par le VIH ont été récupérés et dosés pour la production extracellulaire de p24. (B) Les mêmes quantités de virus, basées sur le dosage p24, sont incubées sur des cellules HeLa TSM-bl permettant d'apprécier l'infectiosité des particules virales produites en mesurant l'expression de la luciférase. Cette mesure est réalisée avec le kit PROMEGA Luciferase assay. (C) Les cellules Jurkat T infectées par HIV-1 NL4.3 et traitées ou non avec la SP. Après 48 h, les cellules sont lysées et déposées sur gel SDS-PAGE avant transfert sur une membrane. Cette membrane a été révélée avec des anticorps dirigés contre les protéines XPB, les protéines gag et env du VIH et GAPDH.

3 – Résultats complémentaires

En complément des résultats en cours de publication, nous nous sommes intéressés à l'état des particules virales produites par les cellules infectées avec le VIH-1 puis traitées par la SP.

3.1 – Production virale en présence de SP

Des cellules Jurkat T sont infectées par un virus HIV NL4.3 pendant 72h à 37°C en présence de SP ou du contrôle. Les surnageants sont récupérés et un dosage p24 est réalisé avec le kit INNOTEST HIV Antigen mAB (Fujirebio) (Figure 31). La SP est responsable de l'inhibition de la production virale, ce qui se traduit par moins de capsides dans le surnageant des cellules infectées (Figure 31 A). Ces surnageants une fois dosés sont ensuite incubés sur des cellules « reportrices » HeLa TZM-bl. Ces cellules contiennent de manière intégrée le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur LTR 5' du VIH, permettant de mesurer l'infectiosité des particules virales ainsi produites. En normalisant la quantité de particules entre les conditions SP et contrôle, on peut observer que les particules produites en présence de SP sont incapables d'activer la production de luciférase à partir du LTR (Figure 31 B). La SP est donc responsable d'une baisse de l'infectiosité des particules produites. A partir de ces résultats, plusieurs hypothèses peuvent être suggérées. Tout d'abord, le défaut de transcription causé par la SP empêche la synthèse d'ARN viraux complets pouvant être encapsidés. Ensuite, la SP empêche la transcription des protéines virales et bloque ainsi la formation de nouveaux virions infectieux. Enfin, en présence de SP, seules des particules immatures sont produites, ce qui compromet l'infection de nouvelles cellules.

Des WB sur les cellules Jurkat T infectées par HIV-1 et traitées ou non par la drogue, montrent une absence de protéines virales synthétisées dans ces cellules (Figure 31 C). Cela laisse supposer qu'au sein des cellules infectées, il y a un défaut de production de protéines virales, en accord avec notre hypothèse d'inhibition de la transcription du LTR dépendante de la protéine Tat.

Ces résultats complémentaires doivent être reproduits afin de confirmer les tendances qu'ils donnent. En effet, si les résultats restent dans cette ligne nous pourrions affirmer que la SP est bien un inhibiteur transcriptionnel du VIH.

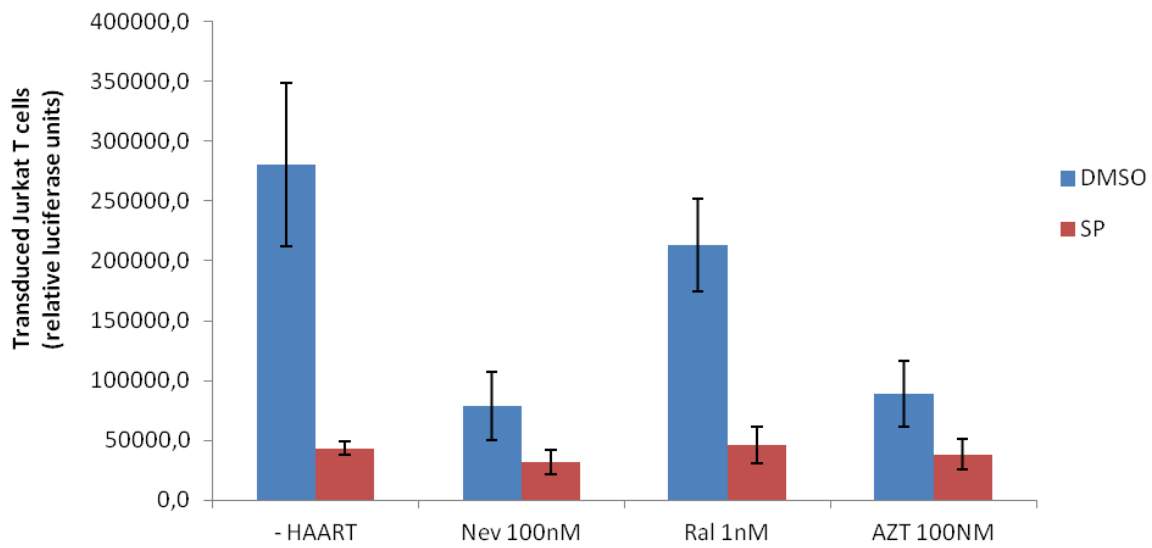


Figure 32 : Effet de la SP en combinaison avec des molécules antirétrovirales. Les cellules Jurkat T sont transduites avec le virus HIV-LTR-Luc. Après la transduction, les cellules sont traitées avec les drogues séparément ou en combinaison avec la SP. La lecture luciférase s'effectue 48h après l'infection avec le kit PROMEGA Luciferase assay, normalisée par la lecture de la Renilla luciférase.

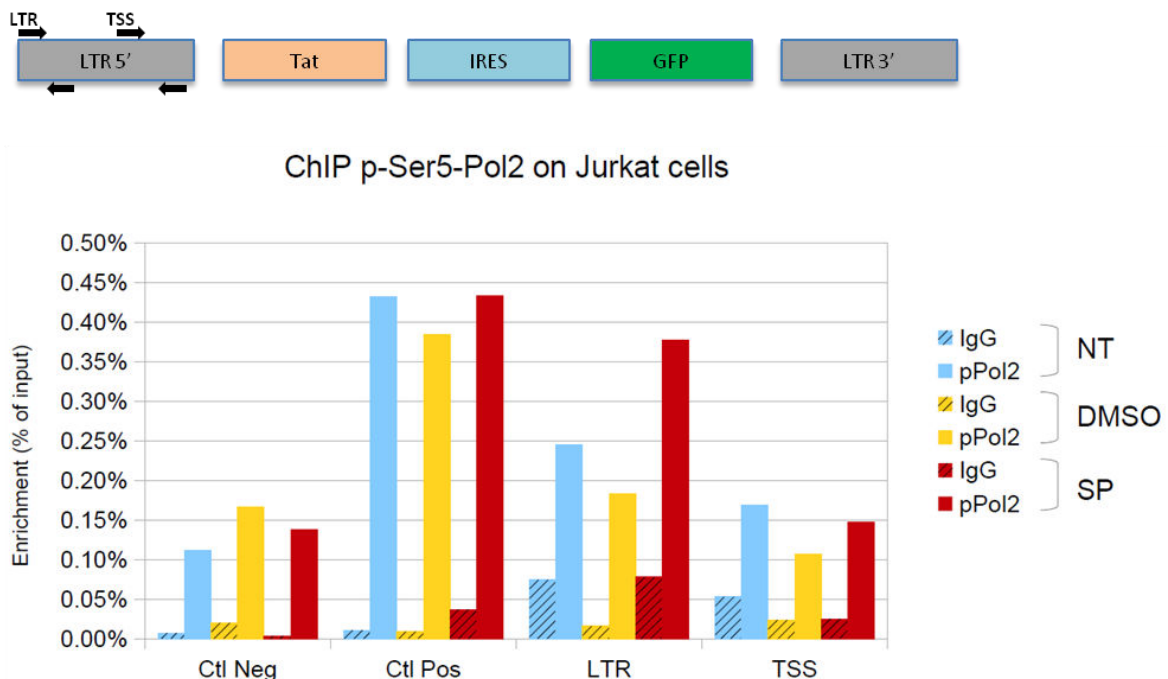


Figure 33 : Effet de la SP sur la place de l'ARN Pol II sur le promoteur LTR du VIH. Schéma représentant la place des primers pour la PCR sur le promoteur LTR du VIH. Les cellules Jurkat sont transduites avec le mini-génomme HIV exprimant Tat, puis traitées à la SP. Après 72h de transduction, la ChIP (préparation des cellules et immunoprécipitation) est réalisée selon le protocole décrit en annexe.

3.2 – Effet de la SP en présence de molécules antirétrovirales

Des expériences préliminaires ont été réalisées en combinant la SP avec certains inhibiteurs utilisés en thérapie antirétrovirale. Nous avons utilisé 2 inhibiteurs de la transcriptase inverse, un NNRTI la névirapine et un NRTI l’AZT, ainsi qu’un inhibiteur de l’intégrase, le raltégravir. Ces molécules ont été utilisées seules ou en combinaison avec la SP sur des cellules Jurkat T transduites par un virus HIV-LTR-Luc (Figure 32).

Les résultats montrent que la SP augmente l’inhibition de l’infection virale lorsqu’elle est utilisée avec les drogues antirétrovirales déjà existantes. La limite de cette expérience est que le niveau d’inhibition de l’infection correspond à celui de la SP seule (-HAART). Il est donc difficile de conclure quant à l’effet synergique potentiel de la SP avec les molécules antirétrovirales. Il faudrait utiliser une concentration plus faible de SP tout en maintenant les concentrations utilisées pour les molécules antirétrovirales.

3.3 – Quelle est l’étape ciblée par la spironolactone?

Pour répondre à cette question, nous avons décidé de mener des expériences d’immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Nous avons utilisé les cellules Jurkat T et le mini-génome du VIH (Figure 33). Les cellules traitées par la SP semblent avoir un problème au niveau de l’initiation de la transcription. En effet, on peut observer une quantité d’ARN Pol II phosphorylée en position 5, forme présente à l’initiation, environ 2 fois plus importante dans la condition SP par rapport à la condition contrôle. Ces résultats suggèrent que la Pol II, une fois phosphorylée sur la sérine 5 de son CTD, est incapable de s’échapper du promoteur et de progresser vers l’élongation. Les résultats sont négatifs pour le site appelé TSS probablement à cause des conditions expérimentales concernant la taille des fragments générés afin de réaliser cette expérience.

Afin de confirmer les résultats, des expériences de ChIP sont réalisées avec un anticorps dirigé contre l’ARN Pol II totale. Ce contrôle nous permettra de savoir si la quantité de polymérase est différente entre les conditions ou alors si cette interruption de la polymérase dans cette position constitue un arrêt de la polymérase. Ces résultats préliminaires laissent supposer que le défaut de transcription semble être la bonne piste concernant l’effet de la SP sur le VIH mais il reste encore quelques étapes, du mécanisme exact par lequel la SP agit sur le VIH, à déterminer.

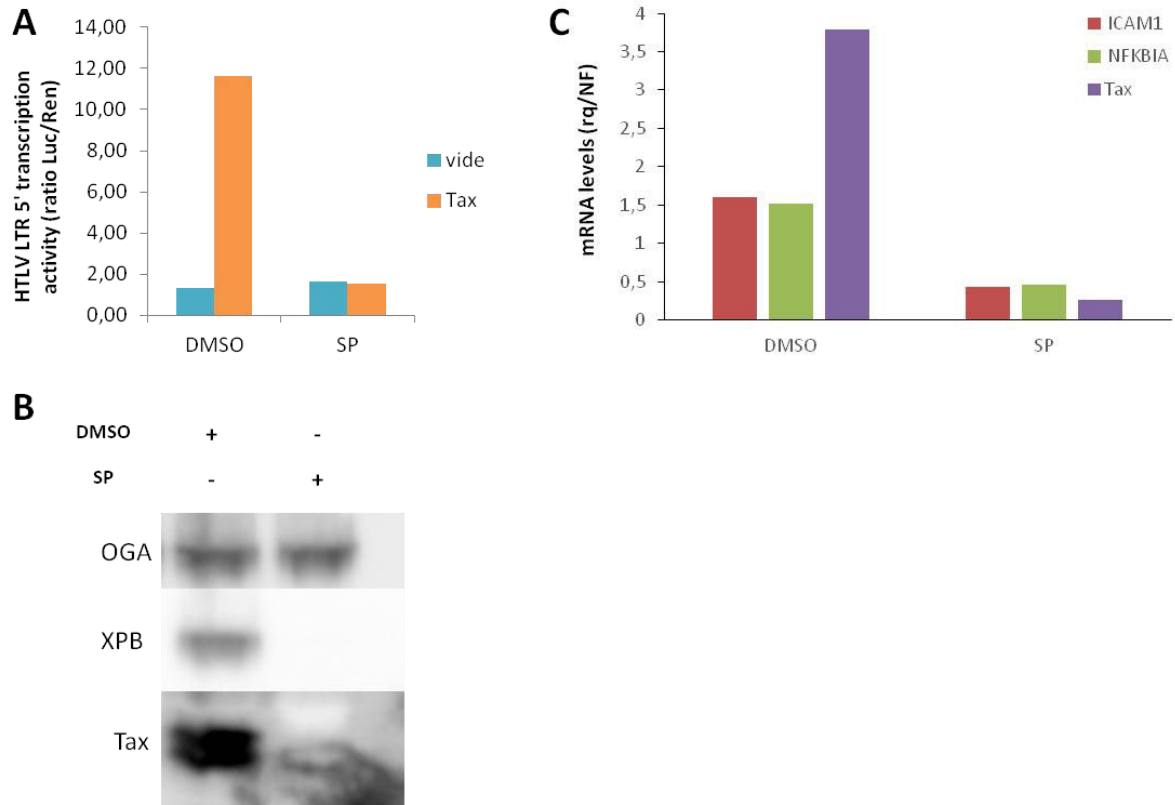


Figure 34 : Effet de la SP sur le promoteur LTR du virus HTLV et conséquences transcriptionnelles. (A) Des cellules Jurkat T sont co-transfectées avec le promoteur viral suivi du gène de la luciférase et un plasmide exprimant la protéine Tax. Les cellules après la transfection sont traitées par la SP ou le contrôle. La luciférase est analysée 48h après la transfection avec le kit PROMEGA Luciferase assay, normalisée par la lecture de la Renilla luciférase. (B) Des cellules C8166, lignée lymphocytaire transformée par le virus HTLV, exprimant uniquement les protéines régulatrices, auxiliaires et antisens du virus, sont traitées 48h avec la spironolactone. Les cellules ont ensuite été lysées et déposées sur gel SDS-PAGE avant transfert sur une membrane. Cette membrane a été révélée avec des anticorps dirigés contre les protéines XPB, Tax et OGA. (C) Les cellules C8166 après traitement par la drogue sont récupérées afin de réaliser de la RT-qPCR sur les gènes Tax ou ceux régulés directement par la protéine virale.

3.4 – Rôle de la spironolactone sur un autre rétrovirus, le virus HTLV

Le virus HTLV-1 est un rétrovirus humain à l'origine de leucémie à cellules T chez l'adulte. Son génome est proche de celui du VIH, il contient les 3 gènes *gag-pol-env* est une région pX codant pour les protéines auxiliaires et régulatrices. Son génome est entouré par des régions promotrices non codantes appelées LTR. Enfin, sa transcription dépend d'une protéine virale appelée Tax qui a chez ce virus, le même effet que Tat pour le VIH.

Nous nous sommes donc intéressés à la transcription du virus HTLV-1, qui est dépendante de la protéine Tax. En premier, nous avons regardé la transactivation de son promoteur LTR 5'. Pour cela nous avons co-transfecté dans des cellules Jurkat T, le promoteur LTR 5' du virus HTLV-1 et un plasmide exprimant la protéine Tax (Figure 34 A). En présence de SP, le promoteur 5' du virus HTLV n'est plus activé par Tax comparé à la transfection d'un vecteur contrôle. Concernant les cellules C8166, lignée lymphocytaire transformée par le virus et qui contient une partie du génome viral, le traitement par la SP bloque la transcription du promoteur du virus ayant pour conséquence une diminution de l'expression de la protéine Tax (Figure 34 B). Afin de contrôler l'effet de la SP, nous avons bien vérifié que la protéine XPB est dégradée par la drogue dans les cellules. Nous avons également analysé que l'expression de la protéine cellulaire OGA, régulée par la protéine Tax, ne soit pas affectée par la drogue. L'analyse des ARN des cellules C8166 montre que le traitement par la SP inhibe la transcription du LTR 5' du virus HTLV, avec une diminution des ARN de Tax (Figure 34 C). Les gènes ICAM-1 et un composant de la voie NF- κ B qui sont directement régulés par la protéine Tax sont également affectés par le traitement par la SP.

Ces résultats complémentaires désignent des effets pour la SP qui nous laisse supposer que nous sommes sur la bonne piste concernant le mécanisme de la spironolactone. Ce dernier pourrait constituer un schéma s'appliquant plus généralement à la transcription des rétrovirus humains. Ces résultats démontrent que la SP est un inhibiteur transcriptionnel du promoteur LTR en condition activée par une protéine viral.

DISCUSSION

Après l'entrée, la transcription inverse et l'intégration, la transcription permet au virus de multiplier les protéines et les matrices d'ARN afin de former de nouvelles particules, assurant sa diffusion dans l'organisme. Les résultats obtenus à partir de nos recherches au laboratoire ont montré que la protéine XPB joue un rôle important lors de la réplication du VIH et plus précisément est nécessaire dans la transcription du virus. Les différents aspects moléculaires abordés dans les résultats mettent en avant le travail effectué dans la compréhension du rôle de la protéine XPB dans le mécanisme de multiplication virale, au sein de cellules cibles de l'infection. Des éléments supplémentaires sont nécessaires pour avoir toutes les pièces du puzzle afin d'établir un modèle complet de l'action de la protéine XPB vis-à-vis du VIH. La seconde observation est le nouveau rôle de la spironolactone, comme molécule anti-VIH. L'effet que nous avons observé laisse penser que cette molécule, après des investigations plus approfondies pourrait s'avérer très intéressante dans l'optique d'une cure fonctionnelle du virus. Quels seraient les points à éclaircir à la suite de ces recherches afin de compléter le projet ?

1 - Rôle de la protéine XPB dans l'infection par le VIH

Précédemment, la protéine XPB a été décrite à la fois comme un facteur inhibiteur (Yoder et al., 2011; Yoder et al., 2006) mais aussi comme un facteur requis pour l'infection virale (Brass et al., 2008; Espeseth et al., 2011). Les résultats obtenus grâce à la spironolactone dans les cellules cibles de l'infection révèlent le rôle de la protéine XPB comme un cofacteur du virus. Cependant, il est difficile dans ces mêmes cellules de mettre en évidence le rôle de la protéine XPB en utilisant des techniques plus communes comme les ARN interférents ou l'expression de mutants, afin de confirmer le rôle réel de cette protéine. Nous sommes convaincus que cette protéine est nécessaire à l'accomplissement de la réplication virale mais le mécanisme dans son ensemble reste encore à élucider.

La délétion quasi complète de la protéine dans les cellules par l'intermédiaire de la drogue n'est pas toxique pour les cellules. Au contraire, il nous a été impossible de diminuer l'expression de la protéine par un système d'ARN interférents au même niveau que la drogue dans ces mêmes cellules. En effet, l'utilisation d'ARN interférents ne permet pas d'obtenir des diminutions d'expression de la protéine supérieures à 60%, contrairement à l'utilisation de la drogue et lorsque la protéine possède ce taux d'expression, les effets sur le virus sont faibles.

Les mutants de la protéine, utilisés pour décrire le rôle inhibiteur de XPB, ont une activité fortement diminuée vis-à-vis de la réparation de l'ADN (Bowden et al., 2015) laissant supposer qu'il est possible de subsister plusieurs années même avec une protéine peu fonctionnelle pour cette activité. De plus

en plus, les maladies associées aux mutations des protéines XPB et XPD, caractérisées au départ comme un défaut dans la réparation de l'ADN, montrent une implication de la transcription (Singh et al., 2015). Mais encore, un modèle murin possédant la protéine XPB mutée de telle manière que les souris expriment un phénotype XP/CS, montre que la mutation de la protéine entraîne une réduction significative de la quantité de TFIIH (Andressoo et al., 2009).

De nombreuses analyses transcriptomiques ont été menées afin de comprendre les effets des mutants de la protéine XPB, responsables de syndromes XP et/ou CS, sur différentes voies de signalisation et mécanismes cellulaires (da Costa et al., 2004). Il a été décrit que de nombreuses protéines et voies sont affectées comme la prolifération, l'oncogenèse, l'apoptose et le cycle cellulaire (da Costa et al., 2004). La question se pose quant aux effets indirects de la mutation de la protéine XPB, exprimée dans des cellules de patients, lors de l'infection par le VIH. Les effets observés par Yoder et ses collaborateurs sont-ils spécifiques de la mutation de la protéine XPB ou la conséquence de la multitude de protéines affectées. L'effet d'un mutant d'une protéine qui a des conséquences immédiates sur ses activités peut-il être comparé à la déplétion totale de cette même protéine par une drogue ?

Aussi, la question de l'étude du promoteur qui conduit la transcription virale est importante. Nous avons pu observer que la diminution de l'expression de la protéine XPB pouvait affecter la réplication de pseudovirus exprimant des gènes sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus (CMV). Ces résultats sont en accord avec ceux décrits avec la protéine mutée par Yoder et ses collaborateurs. Néanmoins, la transcription *in vitro* de ce même promoteur mesurée par l'intermédiaire d'un gène rapporteur n'est pas affectée.

La protéine XPB a été décrite comme un partenaire de SUG1 (Weeda et al., 1997) ainsi que le complexe TFIIH dans son ensemble lorsqu'il est lié à l'ARN Pol II. SUG1 a été identifié comme un membre du protéasome 26S (Makino et al., 1997) mais également comme un membre potentiel du complexe médiateur impliqué dans la transcription. Le travail de Makino et ses collaborateurs suggère que chez le rat, SUG1 possède une activité ATPase dépendante de l'ARN. Leurs hypothèses sont que SUG1 interagit directement avec les ARN messagers et interviendrait dans la régulation et/ou le métabolisme de ces ARN. SUG1 a également été décrit comme un facteur de la transcription pouvant réguler l'activation de la transcription par Tat (Swaffield et al., 1992) dans un système *in vitro* chez la levure.

Les fonctions de SUG1 dans la dégradation ou l'activation dépendante du protéasome de certaines protéines, ainsi que son rôle dans la régulation des ARN, pourraient soulever certaines questions. En effet, si ces rôles sont corrélés à la présence de la protéine XPB, alors sa dégradation par la

spironolactone pourrait affecter des protéines cellulaires ou virales qui ne seraient plus capables d'assurer leur fonction au sein de la multiplication virale. Toutes ces informations peuvent nous interroger sur le fait qu'il existe des mécanismes d'activation de la transcription dépendante de Tat et impliquant XPB et SUG1.

Un nouveau rôle de la protéine XPB est décrit depuis 2013. XPB possède une activité translocase qui permettrait à la protéine de stabiliser le lien entre la Pol II et l'ADN non déroulé, hypothèse décrite par Fishburn et ses collaborateurs. Finalement, cette activité translocase couplée à l'hydrolyse de l'ATP médiée par XPB, serait l'activité essentielle de la protéine lors de la transcription.

Dans notre étude, dans ces cellules lymphocytaires, la protéine XPB est un cofacteur de l'infection du VIH. Afin de confirmer ce rôle de cofacteur de la protéine XPB, il faudrait pouvoir inhiber la dégradation protéasomale de la protéine XPB en présence de SP. Il faudrait identifier les résidus nécessaires à la fixation de la protéine ubiquitine, c'est-à-dire la ou les lysines de la protéine XPB permettant cette fixation covalente entre les protéines. En effet, si l'on mute ce résidu et que la drogue n'est plus capable de dégrader la protéine XPB, alors il nous faudrait ensuite analyser cet effet sur l'infection virale. Si l'inhibition de la réplication virale est toujours présente, alors ce mécanisme est indépendant de la dégradation de la protéine XPB. Si l'inhibition est moindre alors XPB est impliqué mais pas uniquement donc il faudra rechercher les autres partenaires potentiels. Si les résultats sont identiques, alors la diminution de la réplication virale est bien dépendante de la dégradation de la protéine XPB.

Enfin, il n'est pas exclu que le rôle de la protéine XPB dans la transcription virale soit également lié au complexe TFIIH dans son ensemble.

2 - Rôle du complexe TFIIH dans l'infection virale

Une des interrogations précédentes soulève également la question de l'intégrité du complexe. En effet, nous avons pu observer par western blot que les autres protéines du complexe semblent de manière globale stable, au niveau de leur expression individuelle en présence de la spironolactone. Mais le complexe est-il toujours formé en absence de la protéine XPB et plus important encore, peut-on lui attribuer les mêmes fonctions ?

Il serait intéressant de voir si le complexe TFIIH est toujours présent, assemblé et constitué de ses 9 autres sous-unités. En 2014, Alekseev et ses collaborateurs ont montré que la fonction de réparation du complexe était très nettement diminuée en présence de la molécule. Concernant la transcription, les gènes *RARβ2* et *Cyp26* ont été décrits comme affectés par la spironolactone

(Alekseev et al., 2014). Ces gènes sont activés par l'acide rétinoïque dont le récepteur fait partie de la super famille des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, soumis à la même régulation que le récepteur des minéralocorticoïdes. Etant donnée la parenté de ces récepteurs avec les mécanismes de l'aldostérone, ainsi que l'action de la SP sur le récepteur des glucocorticoïdes, il ne paraît pas anormal que leur expression et leur transcription soit affectées par la spironolactone. D'après nos résultats, la transcription basale des gènes n'est pas affectée.

Ces résultats, sur l'effet de la spironolactone, soulèvent certains paradoxes. Tous ces effets sont observés alors que la protéine XPB est la seule du complexe à être dégradée, même si certaines voient leur expression légèrement diminuée après plusieurs jours de traitement. La protéine XPB n'a pas d'effet connu en dehors du complexe TFIIH et sa dégradation semble affecter de manière plus importante la réparation de l'ADN que la transcription (Alekseev et al. 2014). Dans notre cas, nous n'avons pas regardé l'activité de réparation, au-delà de ce qui a déjà été décrit dans la littérature, mais il n'est pas impossible que cette fonction joue un rôle dans l'inhibition du VIH. On peut imaginer que la fonction cellulaire de la protéine subsistante ou alors du complexe est modifiée par la drogue. Mais aussi que l'infection virale soit à l'origine de dommages de l'ADN pouvant être reconnus par le complexe TFIIH et activer la voie NER. Concernant la transcription, une hypothèse possible pour expliquer qu'elle n'est pas affectée serait que les autres kinases présentes, CDK9 et CDK2, puissent phosphoryler le CTD de l'ARN Pol II si le complexe se révèle absent ou inactif. Ces kinases sont capables de phosphoryler le résidu sérine en position 5 du CTD de la Pol II (Deng et al., 2002), mais de manière moins efficace, expliquant cette légère diminution de la transcription observée dans certaines études. Une seconde hypothèse peut être qu'une autre hélicase puisse suppléer le rôle de la protéine XPB. Cette hélicase pourrait être à l'extérieur ou à l'intérieur de TFIIH, XPD peut s'avérer être un bon candidat.

Au sein du complexe, une seconde protéine pourrait se manifester comme importante pour le virus, la protéine XPD. Effectivement, les protéines XPB et XPD semblent être des éléments majeurs de TFIIH dont les activités au sein du complexe sont complémentaires. Il existe peu de mutations de la protéine XPB dans la nature comparée au nombre important de mutations de la protéine XPD à l'origine des différents syndromes (Taylor et al., 1997). Cela met en lumière le rôle essentiel de la protéine XPB mais émet l'hypothèse d'un possible rôle de la protéine XPD dans l'infection virale. Ces 2 protéines sont à l'origine de pathologies similaires, avec des défauts de fonctions enzymatiques, malgré leurs implications différentes dans la transcription et la réparation de l'ADN.

Les mutations de la protéine XPD semblent avoir également un effet sur le VIH (Yoder et al., 2006) mais l'implication spécifique de cette protéine pour l'infection n'a pas encore été démontrée malgré le fait qu'elle soit associée à la même controverse que la protéine XPB. Si une drogue ciblait

spécifiquement XPD, observerait-on les mêmes effets que pour la spironolactone? La protéine XPD peut également se retrouver en complexe avec des protéines importantes dans la ségrégation des chromosomes (Ito, 2010), ce qui pourrait être une piste importante dans l'effet attribué à XPD dans les désordres tels que XP et TTD. Le rôle de la protéine CDK7 comme régulant la transcription apparaît important étant donné que cette protéine possède une activité essentielle dans le complexe et dans la transcription. Le complexe TFIIH a également été décrit comme important dans les modifications post-traductionnelles des histones, la déméthylation de l'ADN et le remodellement de la chromatine (Singh et al., 2015). Mais TFIIH est également présent sur des promoteurs actifs en présence de facteurs de la réparation de l'ADN de la voie NER tel que XPG et XPF. Notamment des facteurs de la réparation ont été décrits comme également impliqués dans la déméthylation de l'ADN (Barreto et al., 2007) et la régulation des gènes (Le May, 2010). Il n'est donc pas impossible que ces facteurs aient un rôle dans la transcription car dans des cellules mutées pour XPD, la transcription est affectée de même que le recrutement de ces facteurs. Il existe de plus en plus d'évidences que la transcription et la réparation sont extrêmement liées l'une à l'autre avec la présence des différents facteurs lors de ces processus même si les activités enzymatiques nécessaires sont différentes. Les régulations de ces deux mécanismes nécessitent des facteurs de réparation et de transcription (Compe and Egly, 2016). La mesure des activités du complexe, dans nos conditions, et sa composition exacte avec la présence de ces autres facteurs semble être nécessaire afin d'en connaître l'état exact et les fonctions toujours disponibles après le traitement par la spironolactone.

3 – Rôle de la spironolactone dans la réplication virale

Au fil des années depuis sa découverte, la spironolactone s'est avérée être une molécule ayant de nombreux effets dans des pathologies diverses et variées. Les résultats obtenus montrent qu'un nouveau rôle de la spironolactone est son effet inhibiteur de l'infection. Le traitement de cellules infectées par le VIH par cette drogue inhibe la réplication et la propagation du virus aux autres cellules. Nous avons testé les lignées lentivirales, VIH-1 et VIH-2 et ces deux virus sont sensibles à l'action de la SP, avec un effet plus faible pour le VIH-2 et pour des virus non répliatifs. Le VIH-2 est un virus moins efficace que le VIH-1, dans le sens où sa multiplication est plus faible. Les séquences de la boucle TAR et des protéines Tat sont très conservées entre les deux souches et possèdent les mêmes mécanismes d'activation de la transcription. Tat des VIH-1 et VIH-2 interagissent avec l'ARN Pol II, menant à une transcription efficace du génome viral (Mavankal et al., 1996). Il serait intéressant de regarder si ces effets sont observés également avec des souches de virus SIV provenant de différentes espèces. Les séquences du motif TAR sont légèrement différentes chez le

SIV, comparées au VIH-1 et concernant les séquences de Tat, elles ne sont pas identiques mais bien conservées. Est-ce que les différences entre les VIH subsistent entre les différentes séquences de Tat et leur capacité à interagir avec leurs partenaires ou alors dans les modifications de la séquence TAR ? Ou alors tout simplement dans le fait que le VIH-2 se réplique moins ?

Les effets que nous avons observés sont en corrélation avec un article récemment publié par Verma et ses collaborateurs, dans lequel la spironolactone est décrite comme bloquant la production du virus Epstein-Barr (EBV) (Verma et al., 2016). Dans cette étude, la spironolactone semble affecter une protéine virale nommée SM qui a pour rôle de favoriser l'expression de transcrits tardifs, sans affecter la viabilité cellulaire. Aucune dégradation de la protéine virale n'est observée mais une diminution de la quantité de particules infectieuses produites par le virus. La spironolactone prévient la formation de la capsid et la réplication de l'ADN viral n'est pas affectée. L'effet décrit dans cet article est comparable à celui que nous avons observé. Verma et ses collaborateurs mettent en évidence un effet transcriptionnel, par l'intermédiaire de la protéine SM, affectant la production de certains gènes viraux. Cet effet est indépendant de la fonction antagoniste de l'aldostérone car comme pour nos résultats, en présence d'éplérénone, aucune inhibition n'est observée. En outre, la protéine SM est un régulateur de certains gènes cellulaires et viraux impliqués dans la réplication du virus (Ruvolo et al., 2004). Notamment, la protéine SM régule la transcription du gène *BMRF1* qui code un cofacteur de la polymérase virale, maintenant l'enzyme sur la matrice et augmentant de ce fait sa processivité. Les hypothèses émises par les auteurs vont dans le sens d'un potentiel partenaire cellulaire qui étant donné le rôle de la protéine SM, pourrait être impliqué dans la transcription.

Une autre protéine de l'EBV a attiré notre attention, la protéine Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2). La protéine EBNA2 est une protéine transactivatrice du promoteur viral, qui joue un rôle dans la régulation de la transcription virale latente et participe à l'immortalisation des cellules infectées par le virus. La protéine EBNA2 est capable d'interagir avec le complexe TFIIH (Tong et al., 1995), ce qui semble être nécessaire pour sa fonction. En tenant compte du rôle de la protéine SM et de sa fonction altérée par la spironolactone ; et du rôle d'EBNA2 en lien avec TFIIH, il faudrait pouvoir comparer l'implication de ces différentes protéines cellulaires et viraux dans le rôle décrit par Verma et ses collaborateurs.

Il s'avère que le mécanisme exact par lequel la spironolactone agit n'est pas encore identifié en ce qui concerne l'effet sur le VIH. En effet, cet antagoniste de l'aldostérone a un rôle même en absence du ligand sur le récepteur ce qui laisse supposer que le récepteur a un rôle cellulaire constitutif. Le récepteur semble bloquer un intermédiaire de la voie NF- κ B ce qui pourrait potentiellement avoir un effet inhibiteur de la transcription virale indépendante de Tat, ce qui ne semble pas être le cas ici ou

alors de façon très minime. Etant donné que l'EPL n'a aucun effet sur l'infection virale, on peut tout de même supposer que l'effet sur le VIH est indépendant de la voie de l'aldostérone. L'EPL n'est pas capable de dégrader la protéine XPB mais ce n'est pas la seule différence qui existe avec la SP. Des études sur ces différences précises entre les deux molécules, en dehors de la voie de l'aldostérone, pourraient permettre de faire un pas supplémentaire vers le rôle spécifique ou non de la dégradation de la protéine XPB sur l'infection virale.

Il serait intéressant de réaliser des analyses de protéomique (SILAC couplé à de la spectrométrie de masse) et de transcriptomique (RNA-seq) afin d'identifier la ou les autres cibles de la spironolactone dans notre modèle expérimental. Ces analyses seraient extrêmement pertinentes sur des cellules traitées ou non avec la drogue mais aussi sur des cellules infectées afin d'avoir les cibles potentielles cellulaires et virales. Cela permettrait de confirmer ou d'infirmer si l'effet de la drogue sur le VIH est uniquement dépendant de la protéine XPB ou pas.

Cette molécule a été décrite comme un inhibiteur spécifique de la protéine XPB via un recrutement de la machinerie du protéasome. L'effet transcriptionnel observé est, d'après nos investigations, dépendant de la protéine XPB, car d'autres intervenants cellulaires ou viraux ne sont pas directement affectés. Dans notre recherche, nous n'avons pas pu dissocier la dégradation de la protéine XPB par la spironolactone, du rôle observé sur le VIH. A la suite de ces résultats, il est possible que la spironolactone affecte d'autres composants viraux ou cellulaires que nous n'avons pas encore suivis. Les éléments majeurs de la transcription, l'expression du complexe P-TEFb, du complexe TFIID dans son ensemble et de la protéine Tat ne semblent pas être modifiée par la drogue. Avec les outils dont nous disposons au laboratoire nous n'avons pas pu mettre en évidence si la délétion de la protéine XPB joue un rôle dans le maintien de l'intégrité du complexe. Les autres sous-unités sont toujours présentes mais le complexe est-il assemblé ? Et plus important, sa fonction est-elle maintenue ?

Un autre fait intéressant est que la spironolactone a une action sur le VIH à des concentrations variables pour les différentes cellules testées (Jurkat et CD4 + primaires vs HeLa). Concernant les lymphocytes, la concentration inhibitrice est la même dans les lignées et les cellules primaires. Par contre, dans les cellules HeLa, un effet identique à celui obtenu pour les lymphocytes demande une concentration plus forte, d'un facteur 2,5 à 5 fois plus important. Nous n'avons pas encore réalisé d'expériences sur des cellules myéloïdes, macrophages ou cellules dendritiques, mais il serait enthousiasmant que les résultats soient les mêmes que dans les lymphocytes primaires, pour des concentrations égales ou plus faibles. Actuellement, nous n'avons pas encore pu déterminer pourquoi les concentrations en spironolactone nécessaires pour obtenir les mêmes niveaux

d'inhibition du VIH sont différentes entre les types cellulaires considérés. Il est probable que le fond génétique des cellules soit important mais également la quantité basale de récepteur dans les cellules. La quantité de récepteurs dans les cellules et l'effet de la spironolactone indépendamment de l'aldostérone peuvent être à l'origine de ces différences. Si la quantité de drogue libre est responsable de l'inhibition virale alors plus le nombre de récepteurs est important, plus il faut de drogues dans le milieu pour lier tous les récepteurs et ainsi observer l'effet de la drogue seule. Pour vérifier cette hypothèse, il faudra donc par la suite, trouver un moyen de quantifier l'expression des récepteurs dans les différents types cellulaires.

La spironolactone a également été décrite comme une molécule activatrice du cytochrome p450 et notamment de l'enzyme CYP3A4. Cette protéine est un composant important du cytochrome p450 lors de procédés de détoxification impliquant des réactions d'oxydation et particulièrement dans le métabolisme de nombreuses drogues. La spironolactone active l'enzyme CYP3A4 sans être elle-même métabolisée par le cytochrome en tant que drogue, alors que l'éplérénone l'est. Il faudrait vérifier parmi les différents composants de ce cytochrome, quelles protéines peuvent également jouer un rôle dans la métabolisation de protéines, cellulaires ou virales, essentielles à la réplication du virus.

Au fil des années, il est apparu que les métabolites de la SP pouvaient avoir un rôle *in vivo* et que par conséquent certains effets donnés à la SP doivent être attribués à ses métabolites (Klauber et al., 1996). Il serait intéressant de regarder si les enzymes nécessaires à la métabolisation sont présentes dans notre système cellulaire afin de savoir s'il existe des métabolites de la spironolactone dans nos expériences et en quelles proportions. En effet, le temps de métabolisation de la SP est de quelques heures et nous incubons les cellules pendant plusieurs jours sans renouveler la drogue dans le milieu. Ces quelques jours, en accord avec les résultats, permettent de maintenir un niveau faible d'expression de la protéine XPB. Quant aux métabolites, leur pic de concentration se situe au bout de 24h. En outre, la métabolisation de la spironolactone se fait en grande partie par des enzymes dépendantes du NADPH au sein du système adrénocortical et le reste est éliminé par le foie (Overdiek et al., 1985). Malgré sa métabolisation rapide, il a déjà été démontré que le pic de concentration survient au bout de quelques heures mais que son action peut être retrouvée jusqu'à 2 jours après la prise.

4 - Rôle de la spironolactone comme molécule antirétrovirale

La spironolactone s'avère être une molécule extrêmement intéressante du point de vue d'une thérapie antivirale car elle cible un cofacteur cellulaire de l'infection sans affecter les processus cellulaires dans lesquels le cofacteur intervient. Cette spécificité pourrait s'avérer très intéressante si après de plus amples études, cette molécule se révèle assez efficace pour être proposée en thérapie. Les effets que nous avons observés au cours de nos recherches laissent supposer que la réplication virale de cellules *de novo* infectées ainsi que la réactivation de virus latents est fortement affectée par la drogue. Ces effets pourraient permettre de bloquer la réplication virale et la réactivation afin de limiter la propagation du virus dans l'organisme et ainsi laisser du temps aux réponses immunitaires de l'hôte. La transcription basale du promoteur serait-elle suffisante afin que des protéines et/ou particules virales soient produites et reconnues par le système immunitaire ?

L'utilisation de la spironolactone en monothérapie contre le VIH semble peu pertinente car elle n'empêche pas les étapes de l'entrée jusqu'à l'intégration. Par contre, il serait intéressant de la coupler avec des molécules déjà utilisées afin de compléter un traitement qui pourrait être plus efficace en bloquant toutes les étapes du cycle de réplication virale. Un des inconvénients de la spironolactone en polythérapie est qu'elle peut activer des enzymes du cytochrome p450, capables d'affecter certaines molécules antirétrovirales qui y sont sensibles.

Au cours de mes recherches, j'ai pu combiner la spironolactone avec des molécules déjà utilisées en traitement ART. Nous avons utilisé des inhibiteurs nucléosidique et non-nucléosidique de la transcriptase inverse et un inhibiteur d'intégrase en complément de la spironolactone. Les résultats obtenus nous laissent perplexes car l'effet observé n'apparaît pas plus fort que l'effet de la SP seule. Toutefois, il faudrait utiliser la SP à des concentrations plus faibles tout en conservant les concentrations choisies pour les autres inhibiteurs afin de voir si réellement il est possible d'observer une synergie entre les molécules.

Outre ce problème, des effets de la SP sont observés dans de nombreux cas. Depuis sa découverte à la fin des années 50, de nombreuses pathologies peuvent être traitées par la drogue et plusieurs rôles dans des domaines très différents lui sont reconnus. Si le mécanisme par lequel la spironolactone inhibe le VIH est différent de son action dans ses autres activités connues alors il serait judicieux d'identifier la structure chimique spécifique de cette fonction. Une autre molécule, la Triptolide, qui est capable de dégrader plusieurs protéines Tat et l'ARN Pol II, semble être intéressante pour contrer la réplication virale. Ces divers effets sont mis en évidence à des

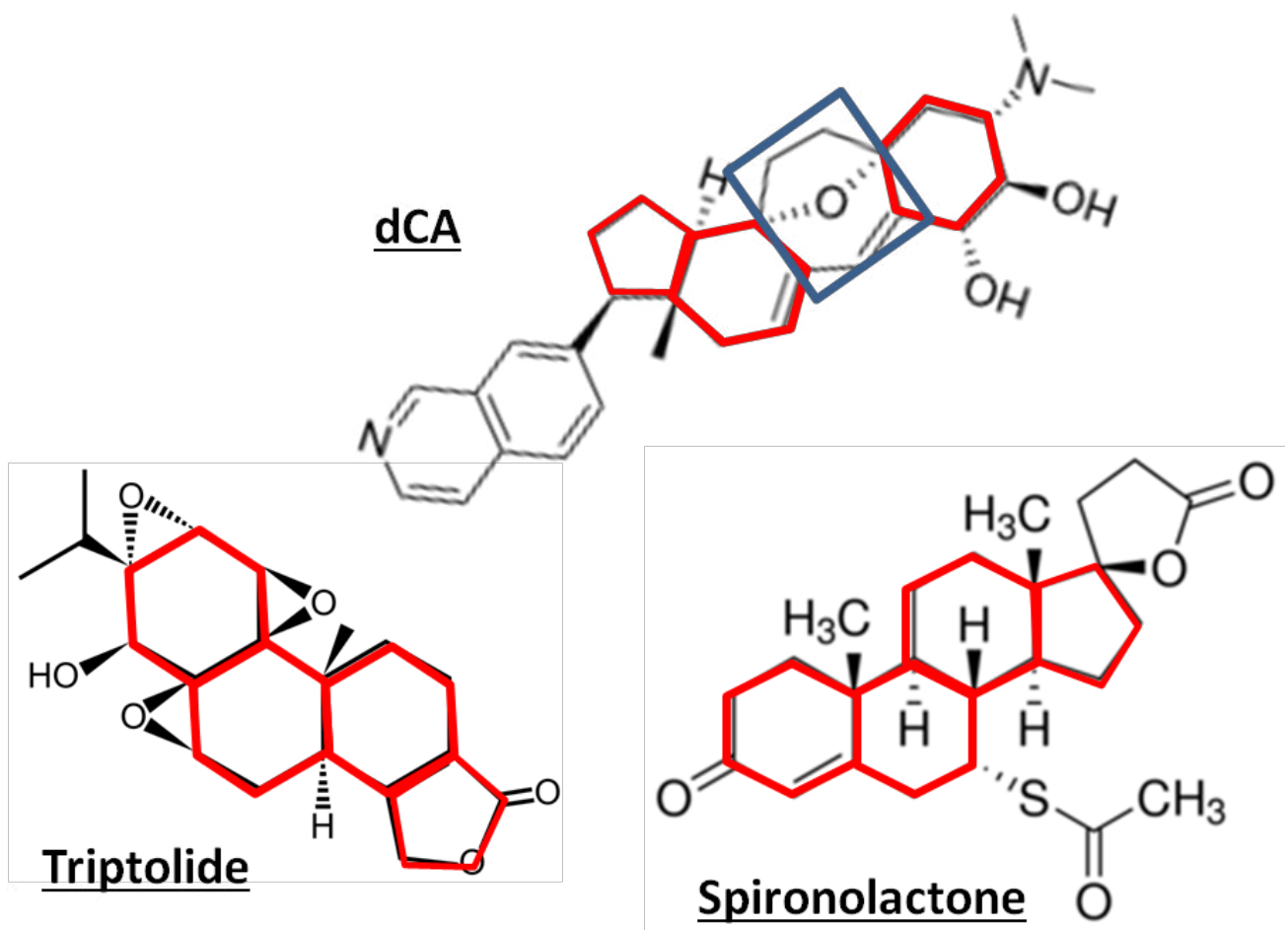


Figure 35 : Comparaison des structures de molécules inhibitrices de la transcription virale. Les structures chimiques des 3 molécules inhibitrices de la transcription. En rouge sont représentés les cycles communs partagés par les molécules. En bleu est représenté le groupe caractérisant la différence entre la dCA et les autres molécules.

concentrations très différentes, laissant supposer une certaine spécificité en fonction de la dose utilisée. Malgré qu'elle possède des effets délétères pour plusieurs processus cellulaires importants (Qiu et al., 1999), la triptolide est testée en essai clinique. Mais le but de l'identification de tels inhibiteurs est de synthétiser une molécule avec des effets spécifiques contre le VIH et si possible aucun effet secondaire.

Des effets dose dépendant ont également été mis en évidence pour la spironolactone. Ces points communs avec des drogues comme la triptolide, concernant la dégradation des protéines et l'effet transcriptionnel mais aussi avec la dCA, qui partage cette inhibition de la transcription Tat dépendante, en font un bon candidat comme inhibiteur du VIH.

La découverte récente de ces molécules pourrait déboucher vers la synthèse de molécules inhibitrices de la transcription virale. De manière naïve, ces molécules semblent partager des éléments de structure plus ou moins similaires (Figure 35), au moins concernant la spironolactone et la triptolide. La dCA quant à elle semble partager moins de similarité structurelle avec les deux autres molécules citées. Par contre, la dCA et la spironolactone sont toutes les deux des molécules issues de dérivés stéroïdiens, ce qui permettrait hypothétiquement d'expliquer leur action proche en ce qui concerne le VIH. Néanmoins, l'avis de chimistes serait intéressant pour savoir si ces éléments communs dans les structures sont responsables des caractéristiques partagées par ces molécules.

Des expériences préliminaires ont mis en évidence un effet de la spironolactone sur un autre rétrovirus, le virus HTLV. Le virus HTLV est le second rétrovirus humain, sa transcription se fait à partir de promoteurs LTR qui sont différents de ceux du VIH et il possède également une protéine activatrice nommée Tax (Transactivator of Px). De la même manière que la transcription Tat dépendante du VIH est affectée par la spironolactone, nos résultats suggèrent une inhibition Tax dépendante de la transcription de HTLV en présence de la spironolactone. Les mécanismes d'initiation de la transcription des deux virus sont différents puisque Tax recrute spécifiquement CREB et CBP/p300 afin d'activer la transcription à partir du LTR du virus HTLV (Kashanchi and Brady, 2005). Chez les VIH, la transcription basale est indépendante des facteurs CBP/p300 et CREB mais dépend plutôt des facteurs SP1 et NF- κ B. La voie NF- κ B est également très présente pour la réplication du virus HTLV et fortement affectée par Tax. Les 2 rétrovirus partagent un fait indéniable : les facteurs de transcription de la famille NF- κ B interagissent avec les promoteurs viraux et jouent un rôle important dans leurs transcriptions (Chan and Greene, 2012).

Alors que pour le VIH l'étape d'élongation semble être la condition limitante de la transcription, pour le virus HTLV ce n'est pas aussi catégorique. L'initiation de la transcription du LTR du virus HTLV est dépendante de l'ARN Pol II et des facteurs généraux de transcription. Même en l'absence de résultat concret concernant le virus HTLV pour l'étape limitante de sa transcription, il a été démontré que Tax pouvait de la même manière que Tat interagir avec P-TEFb et le libérer de son

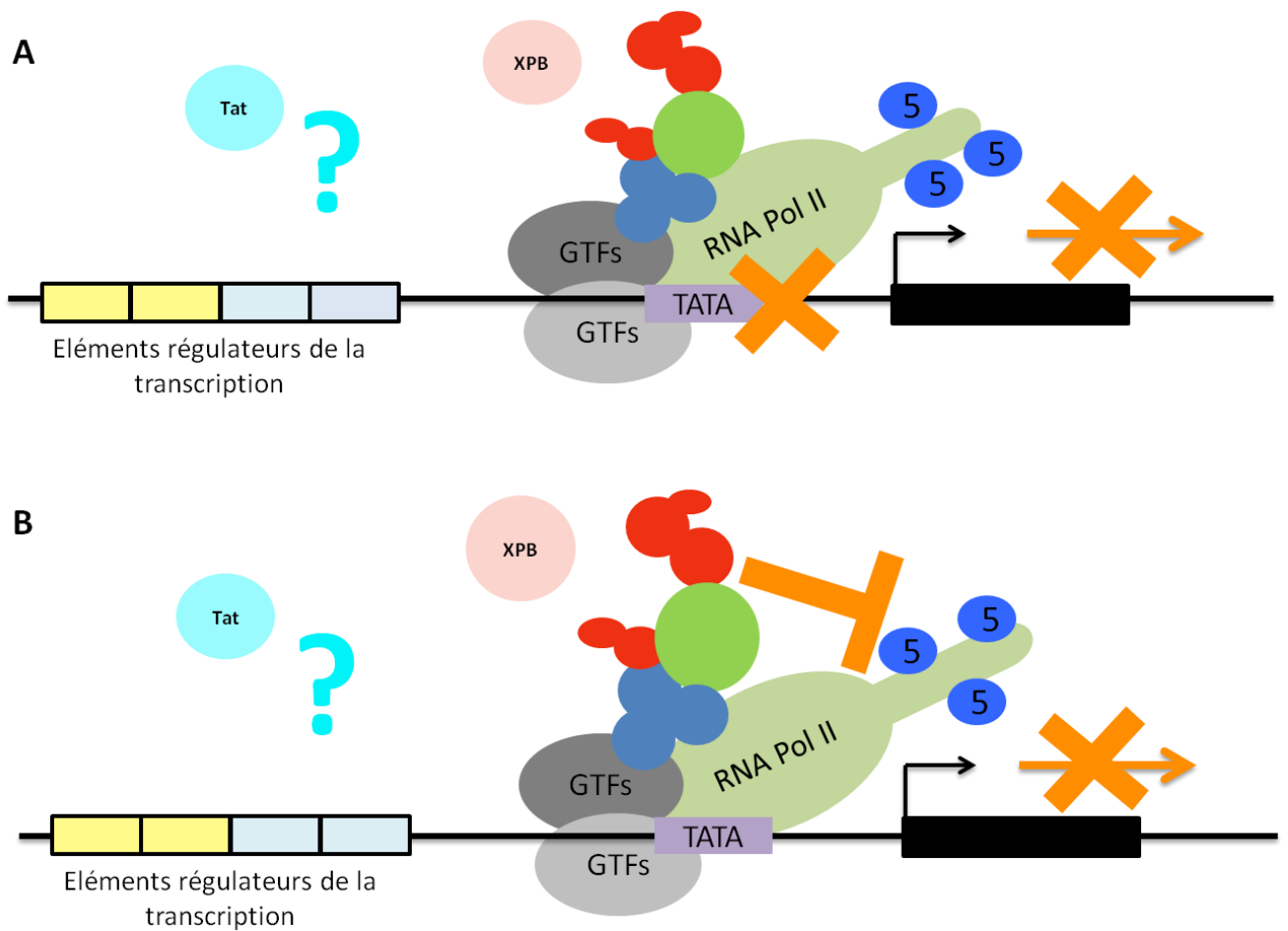


Figure 36 : Modélisation de l'effet de la SP sur la transcription du promoteur du VIH. (A) La SP en dégradant la protéine XPB empêche l'ouverture de l'ADN, fonction de la protéine lors de la transcription. (B) La SP en dégradant la protéine XPB bloque la fonction du complexe qui est de phosphoryler le résidu sérine en position 5 sur le CTD de l'ARN Pol II, maintenant la polymérase au site d'assemblage du complexe d'initiation.

inhibiteur HEXIM/7SK (Cho et al., 2010). Ces informations permettent de supposer qu'il existe un mécanisme commun d'activation des LTR du VIH et du virus HTLV, dépendant de Tat et Tax respectivement. On peut aussi supposer que lors de ces mécanismes de transcription à partir des promoteurs LTR des 2 virus, la spironolactone inhibe un facteur cellulaire essentiel et commun.

Les effets obtenus sur le VIH-1 et le VIH-2 ainsi que sur le rétrovirus HTLV laissent supposer que cette molécule agit de manière spécifique. Il subsiste toujours cette inhibition de l'EBV par la spironolactone mais dont l'impact de potentiel cofacteur transcriptionnel n'a pas été étudié. Cette inhibition Tat-dépendante pourrait être en accord un modèle proposé, qui consiste en une cure fonctionnelle vis-à-vis du VIH bloquant la multiplication virale (Mousseau et al. 2015b). Cette cure fonctionnelle est basée sur le principe selon lequel il est possible de rendre entièrement silencieux le promoteur viral. Une fois le promoteur silencieux, aucune protéine virale n'est synthétisée et donc le virus ne se propage pas. L'idée associée à cette mise en silence du promoteur est que cet effet est maintenu à long terme. Cet état permanent, durant lequel le virus est présent mais sa transcription complètement inhibée, permet de vivre avec le virus sans aucune conséquence liée à la réplication virale. Cette théorie s'oppose au modèle réactivation et destruction. Ce modèle consiste à réactiver les réservoirs afin de tuer les cellules hébergeant les provirus latents. Ce modèle montre des limites car la taille du réservoir viral a été sous-estimée et s'avère bien plus importante que prévu. La découverte de ces molécules bloquant la transcription virale peut constituer un apport non négligeable dans le but d'améliorer encore plus les thérapies existantes en bloquant une étape importante dans la réplication virale (Le Douce et al., 2016).

Nos hypothèses concernant l'effet de la spironolactone vis-à-vis de la transcription virale peuvent se résumer en 2 schémas (Figure 36).

La dégradation de la protéine XPB empêche sa fonction au sein du complexe TFIIH, qui est ancré simultanément sur le promoteur avec l'ARN Pol II (Figure 36 A). Au niveau du site de départ de la transcription, XPB est incapable d'ouvrir l'ADN alors que la kinase CDK7 phosphoryle le CTD de l'ARN Pol II. Cet ADN fermé ne permet pas à la polymérase de progresser le long du brin matrice.

La seconde hypothèse est que la dégradation de la protéine XPB empêche la fonction du complexe TFIIH qui est de phosphoryler le CTD de l'ARN Pol II (Figure 36 B). Cette absence de phosphorylation bloque la polymérase au site de départ de la transcription. Tous les facteurs nécessaires à la transcription sont présents mais le CTD n'étant pas phosphorylé, la polymérase est maintenue à son site de recrutement.

Et le rôle de Tat dans ce système ? La protéine Tat a déjà été identifiée au niveau de l'initiation comme importante pour le recrutement de facteurs de régulation de la transcription. Le fait que la transcription virale soit bloquée entraîne une absence de Tat qui ne peut pas activer la synthèse

d'autres protéines Tat. Cette inhibition bloque la transcription même à bas bruit, ne permettant pas au système de s'emballer comme c'est le cas quand Tat transactive sans interruption et efficacement le promoteur viral.

Concernant les rétrovirus, la spironolactone dans son intégralité ou des dérivés synthétisés après identification du groupe inhibiteur permettraient d'envisager des essais plus poussés. Il serait intéressant la spironolactone sur des cellules chroniquement infectées par le virus, issues de patients de cohortes. Pour que la spironolactone puisse entrer dans des essais plus appliqués, il faudrait que la drogue soit capable de bloquer fortement la réactivation virale en absence de traitement, mais aussi d'inhiber la réplication du virus dans d'autres types cellulaires jusqu'à un niveau non détectable. Si ces conditions peuvent être réunies alors il faudra considérer cette molécule ou ses dérivés actifs comme de potentielles molécules utilisables en thérapie antirétrovirale, comme l'est actuellement la dCA.

REFERENCES

- Ahokas, R.A., Sun, Y., Bhattacharya, S.K., Gerling, I.C., and Weber, K.T. (2005). Aldosteronism and a Proinflammatory Vascular Phenotype: Role of Mg²⁺, Ca²⁺, and H₂O₂ in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Circulation* *111*, 51-57.
- Akoulitchev, S., Chuikov, S., and Reinberg, D. (2000). TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes. *Nature* *407*, 102-106.
- Alekseev, S., Ayadi, M., Brino, L., Egly, J.-M., Larsen, Annette K., and Coin, F. (2014). A Small Molecule Screen Identifies an Inhibitor of DNA Repair Inducing the Degradation of TFIIH and the Chemosensitization of Tumor Cells to Platinum. *Chemistry & Biology* *21*, 398-407.
- Allaway, G.P., Davis-Bruno, K.L., Beaudry, G.A., Garcia, E.B., Wong, E.L., Ryder, A.M., Hasel, K.W., Gauduin, M.-C., Koup, R.A., McDougal, J.S., *et al.* (1995). Expression and Characterization of CD4-IgG2, a Novel Heterotetramer That Neutralizes Primary HIV Type 1 Isolates. *AIDS Research and Human Retroviruses* *11*, 533-539.
- Amador, C.A., Barrientos, V., Peña, J., Herrada, A.A., González, M., Valdés, S., Carrasco, L., Alzamora, R., Figueroa, F., Kalergis, A.M., *et al.* (2014). Spironolactone Decreases DOCA–Salt–Induced Organ Damage by Blocking the Activation of T Helper 17 and the Downregulation of Regulatory T Lymphocytes. *Hypertension* *63*, 797-803.
- Andressoo, J.-O., Weeda, G., de Wit, J., Mitchell, J.R., Beems, R.B., van Steeg, H., van der Horst, G.T.J., and Hoeijmakers, J.H. (2009). An Xpb Mouse Model for Combined Xeroderma Pigmentosum and Cockayne Syndrome Reveals Progeroid Features upon Further Attenuation of DNA Repair. *Molecular and Cellular Biology* *29*, 1276-1290.
- Arya, S., Guo, C., Josephs, S., and Wong-Staal, F. (1985). Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* *229*, 69-73.
- Ayinde, D., Maudet, C., Transy, C., and Margottin-Goguet, F. (2010). Limelight on two HIV/SIV accessory proteins in macrophage infection: Is Vpx overshadowing Vpr? *Retrovirology* *7*, 1-12.
- Azevedo-Pereira, J.M., Pedro, C., Marta, C., Quirina, S.-C., and Pedro, B. (2015). Inhibition of HIV Replication by Host Cellular Factors. In.
- Baba, M., Tanaka, H., De Clercq, E., Pauwels, R., Balzarini, J., Schols, D., Nakashima, H., Perno, C.F., Walker, R.T., and Miyasaka, T. (1989). Highly specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by a novel 6-substituted acyclouridine derivative. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *165*, 1375-1381.
- Bai, J., Sui, J., Zhu, R.Y., Tallarico, A.S.C., Gennari, F., Zhang, D., and Marasco, W.A. (2003). Inhibition of Tat-mediated Transactivation and HIV-1 Replication by Human Anti-hCyclinT1 Intrabodies. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 1433-1442.

- Baldauf, H.-M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., *et al.* (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 18, 1682-1689.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., *et al.* (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220.
- Barreto, G., Schafer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S.K., Handa, V., Doderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., *et al.* (2007). Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445, 671-675.
- Barski, A. (2010). Pol II and its associated epigenetic marks are present at Pol III-transcribed noncoding RNA genes. *Nature Struct Mol Biol* 17, 629-634.
- Bec, G., Meyer, B., Gerard, M.-A., Steger, J., Fauster, K., Wolff, P., Burnouf, D., Micura, R., Dumas, P., and Ennifar, E. (2013). Thermodynamics of HIV-1 Reverse Transcriptase in Action Elucidates the Mechanism of Action of Non-Nucleoside Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* 135, 9743-9752.
- Bedoya, L.M., Abad, M.J., Calonge, E., Saavedra, L.A., Gutierrez C, M., Kouznetsov, V.V., Alami, J., and Bermejo, P. (2010). Quinoline-based compounds as modulators of HIV transcription through NF- κ B and Sp1 inhibition. *Antiviral Research* 87, 338-344.
- Bendtzen, K., Hansen, P.R., Rieneck, K., and The Spironolactone/Arthritis Study, G. (2003). Spironolactone inhibits production of proinflammatory cytokines, including tumour necrosis factor- α and interferon- γ , and has potential in the treatment of arthritis. *Clinical and Experimental Immunology* 134, 151-158.
- Berkhout, B., Gatignol, A., Rabson, A.B., and Jeang, K.-T. (1990). TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: Evidence that Tat requires specific regions of the promoter. *Cell* 62, 757-767.
- Bernardes de Jesus, B.M., Bjørås, M., Coin, F., and Egly, J.M. (2008). Dissection of the Molecular Defects Caused by Pathogenic Mutations in the DNA Repair Factor XPC. *Molecular and Cellular Biology* 28, 7225-7235.
- Biglione, S., Byers, S.A., Price, J.P., Nguyen, V.T., Bensaude, O., Price, D.H., and Maury, W. (2007). Inhibition of HIV-1 replication by P-TEFb inhibitors DRB, seliciclib and flavopiridol correlates with release of free P-TEFb from the large, inactive form of the complex. *Retrovirology* 4, 1-12.
- Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S., and Hanawalt, P.C. (1985). DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 40, 359-369.
- Booth, R.E., Johnson, J.P., and Stockand, J.D. (2002). ALDOSTERONE. *Advances in Physiology Education* 26, 8-20.
- Bour, S., Perrin, C., and Strebel, K. (1999). Cell Surface CD4 Inhibits HIV-1 Particle Release by Interfering with Vpu Activity. *Journal of Biological Chemistry* 274, 33800-33806.

- Bowden, N., Beveridge, N., Ashton, K., Baines, K., and Scott, R. (2015). Understanding Xeroderma Pigmentosum Complementation Groups Using Gene Expression Profiling after UV-Light Exposure. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 15985.
- Bowerman, B., Brown, P.O., Bishop, J.M., and Varmus, H.E. (1989). A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes & Development* 3, 469-478.
- Brass, A., Dykxhoorn, D., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R., Lieberman, J., and Elledge, S. (2008). Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319, 921 - 926.
- Briz, V., Poveda, E., and Soriano, V. (2006). HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57, 619-627.
- Brown, N.J. (2008). Aldosterone and Vascular Inflammation. *Hypertension* 51, 161-167.
- Burdick, R., Smith, J., Chaipan, C., Friew, Y., Chen, J., Venkatachari, N., Delviks-Frankenberry, K., Hu, W., and Pathak, V. (2010). P body-associated protein Mov10 inhibits HIV-1 replication at multiple stages. *J Virol* 84, 10241 - 10253.
- Burkly, L.C., Olson, D., Shapiro, R., Winkler, G., Rosa, J.J., Thomas, D.W., Williams, C., and Chisholm, P. (1992). Inhibition of HIV infection by a novel CD4 domain 2-specific monoclonal antibody. Dissecting the basis for its inhibitory effect on HIV-induced cell fusion. *The Journal of Immunology* 149, 1779-1787.
- Cecchetti, V., Parolin, C., Moro, S., Pecere, T., Filipponi, E., Calistri, A., Tabarrini, O., Gatto, B., Palumbo, M., and Fravolini, A. (2000). 6-Aminoquinolones as New Potential Anti-HIV Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 43, 3799-3802.
- Chan, J.K., and Greene, W.C. (2012). Dynamic roles for NF- κ B in HTLV-I and HIV-1 retroviral pathogenesis. *Immunological Reviews* 246, 286-310.
- Chao, S.-H., Fujinaga, K., Marion, J.E., Taube, R., Sausville, E.A., Senderowicz, A.M., Peterlin, B.M., and Price, D.H. (2000). Flavopiridol Inhibits P-TEFb and Blocks HIV-1 Replication. *Journal of Biological Chemistry* 275, 28345-28348.
- Chen, D. (2000). Activation of estrogen receptor- α by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIID and participation of CDK7. *Mol Cell* 6, 127-137.
- Chen, F., Gao, X., and Shilatifard, A. (2015). Stably paused genes revealed through inhibition of transcription initiation by the TFIID inhibitor triptolide. *Genes & Development* 29, 39-47.
- Chen, H., Sun, F., Zhong, X., Shao, Y., Yoshimura, A., and Liu, Y. (2013). Eplerenone-Mediated Aldosterone Blockade Prevents Renal Fibrosis by Reducing Renal Inflammation, Interstitial Cell Proliferation and Oxidative Stress. *Kidney and Blood Pressure Research* 37, 557-566.
- Chen, S.-y., Bhargava, A., Mastroberardino, L., Meijer, O.C., Wang, J., Buse, P., Firestone, G.L., Verrey, F., and Pearce, D. (1999). Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 2514-2519.

- Cho, W.-K., Jang, M.K., Huang, K., Pise-Masison, C.A., and Brady, J.N. (2010). Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Tax Protein Complexes with P-TEFb and Competes for Brd4 and 7SK snRNP/HEXIM1 Binding. *Journal of Virology* *84*, 12801-12809.
- Chun, T.-W., Engel, D., Berrey, M.M., Shea, T., Corey, L., and Fauci, A.S. (1998). Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4+ T cells during primary HIV-1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *95*, 8869-8873.
- Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., *et al.* (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection [see comments]. *Nature* *387*.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M., Santos-Ferreira, M., Laurent, A., Daguuet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., *et al.* (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* *233*, 343-346.
- Clavel, F., and Hance, A.J. (2004). HIV Drug Resistance. *New England Journal of Medicine* *350*, 1023-1035.
- Cleaver, J.E. (2005). Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* *5*, 564-573.
- Coin, F., Marinoni, J.-C., Rodolfo, C., Fribourg, S., Pedrini, A.M., and Egly, J.-M. (1998). Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nat Genet* *20*, 184-188.
- Coin, F., Oksenysh, V., and Egly, J.-M. (2007). Distinct Roles for the XPB/p52 and XPD/p44 Subcomplexes of TFIIH in Damaged DNA Opening during Nucleotide Excision Repair. *Molecular Cell* *26*, 245-256.
- Colin, L., Verdin, E., and Van Lint, C. (2014). HIV-1 chromatin, transcription, and the regulatory protein Tat. *Methods In Molecular Biology (Clifton, NJ)* *1087*, 85-101.
- Compe, E., and Egly, J.-M. (2012). TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* *13*, 343-354.
- Compe, E., and Egly, J.-M. (2016). Nucleotide Excision Repair and Transcriptional Regulation: TFIIH and Beyond. *Annual Review of Biochemistry* *85*, 265-290.
- Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1989). An RNA polymerase II transcription factor has an associated DNA-dependent ATPase (dATPase) activity strongly stimulated by the TATA region of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *86*, 7356-7360.
- Cujec, T.P., Okamoto, H., Fujinaga, K., Meyer, J., Chamberlin, H., Morgan, D.O., and Peterlin, B.M. (1997). The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & Development* *11*, 2645-2657.
- da Costa, R.M.A., Riou, L., Paquola, A., Menck, C.F.M., and Sarasin, A. (2004). Transcriptional profiles of unirradiated or UV-irradiated human cells expressing either the cancer-prone XPB//CS allele or the noncancer-prone XPB//TTD allele. *Oncogene* *24*, 1359-1374.

- De Clercq, E. (1998). The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Antiviral Research* 38, 153-179.
- de Gasparo, M., Joss, U., Ramjouwé, H.P., Whitebread, S.E., Haenni, H., Schenkel, L., Kraehenbuehl, C., Biollaz, M., Grob, J., and Schmidlin, J. (1987). Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 240, 650-656.
- Deng, L., Ammosova, T., Pumfery, A., Kashanchi, F., and Nekhai, S. (2002). HIV-1 Tat interaction with RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) and a dynamic association with CDK2 induce CTD phosphorylation and transcription from HIV-1 promoter. *J Biol Chem* 277.
- Depienne, C., Mousnier, A., Leh, H., Le Rouzic, E., Dormont, D., Benichou, S., and Dargemont, C. (2001). Characterization of the Nuclear Import Pathway for HIV-1 Integrase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 18102-18107.
- Descours, B., Cribier, A., Chable-Bessia, C., Ayinde, D., Rice, G., Crow, Y., Yatim, A., Schwartz, O., Laguette, N., and Benkirane, M. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4+T-cells. *Retrovirology* 9, 1-8.
- Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., *et al.* (2005). Maraviroc (UK-427,857), a Potent, Orally Bioavailable, and Selective Small-Molecule Inhibitor of Chemokine Receptor CCR5 with Broad-Spectrum Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 4721-4732.
- Dubé, M., Paquay, C., Roy, B.B., Bego, M.G., Mercier, J., and Cohen, É.A. (2011). HIV-1 Vpu Antagonizes BST-2 by Interfering Mainly with the Trafficking of Newly Synthesized BST-2 to the Cell Surface. *Traffic* 12, 1714-1729.
- Dvir, A. (1996). A role for ATP and TFIIF in activation of the RNA polymerase II preinitiation complex prior to transcription initiation. *J Biol Chem* 271, 7245-7248.
- Dvir, A., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1997). A role for TFIIF in controlling the activity of early RNA polymerase II elongation complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 9006-9010.
- Edelman, I.S., Bogoroch, R., and Porter, G.A. (1963). ON THE MECHANISM OF ACTION OF ALDOSTERONE ON SODIUM TRANSPORT: THE ROLE OF PROTEIN SYNTHESIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 50, 1169-1177.
- Engelman, A., Mizuuchi, K., and Craigie, R. (1991). HIV-1 DNA integration: Mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* 67, 1211-1221.
- Espeseth, A.S., Fishel, R., Hazuda, D., Huang, Q., Xu, M., Yoder, K., and Zhou, H. (2011). siRNA Screening of a Targeted Library of DNA Repair Factors in HIV Infection Reveals a Role for Base Excision Repair in HIV Integration. *PLoS ONE* 6, e17612.
- Evans, E., Moggs, J.G., Hwang, J.R., Egly, J.M., and Wood, R.D. (1997). Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *The EMBO Journal* 16, 6559-6573.

- Fan, L., Arvai, A.S., Cooper, P.K., Iwai, S., Hanaoka, F., and Tainer, J.A. (2006). Conserved XPB Core Structure and Motifs for DNA Unwinding: Implications for Pathway Selection of Transcription or Excision Repair. *Molecular Cell* 22, 27-37.
- Fishburn, J., Tomko, E., Galburt, E., and Hahn, S. (2015). Double-stranded DNA translocase activity of transcription factor TFIIH and the mechanism of RNA polymerase II open complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 3961-3966.
- Flores, O., Lee, G., Kessler, J., Miller, M., Schlieff, W., Tomassini, J., and Hazuda, D. (1999). Host-cell positive transcription elongation factor b kinase activity is essential and limiting for HIV type 1 replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 7208-7213.
- Fousteri, M., Vermeulen, W., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H.F. (2006). Cockayne Syndrome A and B Proteins Differentially Regulate Recruitment of Chromatin Remodeling and Repair Factors to Stalled RNA Polymerase II In Vivo. *Molecular Cell* 23, 471-482.
- Friedemann, J., Grosse, F., and Zhang, S. (2005). Nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) interacts with Werner syndrome helicase and stimulates its exonuclease activity. *J Biol Chem* 280, 31303 - 31313.
- Fujii, R., Okamoto, M., Aratani, S., Oishi, T., Ohshima, T., Taira, K., Baba, M., Fukamizu, A., and Nakajima, T. (2001). A Role of RNA Helicase A in cis-Acting Transactivation Response Element-mediated Transcriptional Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Biol Chem* 276, 5445 - 5451.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D., and Trono, D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 94.
- Gallo, R., Sarin, P., Gelmann, E., Robert-Guroff, M., Richardson, E., Kalyanaraman, V., Mann, D., Sidhu, G., Stahl, R., Zolla-Pazner, S., *et al.* (1983). Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 865-867.
- Ganuza, M., Sáiz-Ladera, C., Cañamero, M., Gómez, G., Schneider, R., Blasco, M.A., Pisano, D., Paramio, J.M., Santamaría, D., and Barbacid, M. (2012). Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion. *The EMBO Journal* 31, 2498-2510.
- García-Martínez, L.F., Mavankal, G., Neveu, J.M., Lane, W.S., Ivanov, D., and Gaynor, R.B. (1997). Purification of a Tat-associated kinase reveals a TFIIH complex that modulates HIV-1 transcription. *The EMBO Journal* 16, 2836-2850.
- Gerard, M., Fischer, L., Moncollin, V., Chipoulet, J.M., Chambon, P., and Egly, J.M. (1991). Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. *Journal of Biological Chemistry* 266, 20940-20945.
- Goody, R.S., Müller, B., and Restle, T. (1991). Factors contributing to the inhibition of HIV reverse transcriptase by chain-terminating nucleotides in vitro and in vivo.
- Goujon, C., Moncorge, O., Bauby, H., Doyle, T., Ward, C.C., Schaller, T., Hue, S., Barclay, W.S., Schulz, R., and Malim, M.H. (2013). Human MX2 is an interferon-induced post-entry inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* 502, 559-562.

- Greenblatt, D.J., and Koch-Weser, J. (1973). Adverse reactions to spironolactone: A report from the boston collaborative drug surveillance program. *JAMA* 225, 40-43.
- Guo, Q., Ho, H.-T., Dicker, I., Fan, L., Zhou, N., Friborg, J., Wang, T., McAuliffe, B.V., Wang, H.-g.H., Rose, R.E., *et al.* (2003). Biochemical and Genetic Characterizations of a Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibitor That Blocks gp120-CD4 Interactions. *Journal of Virology* 77, 10528-10536.
- Guzik, T.J., Hoch, N.E., Brown, K.A., McCann, L.A., Rahman, A., Dikalov, S., Goronzy, J., Weyand, C., and Harrison, D.G. (2007). Role of the T cell in the genesis of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 2449-2460.
- Han, Y., Lassen, K., Monie, D., Sedaghat, A.R., Shimoji, S., Liu, X., Pierson, T.C., Margolick, J.B., Siliciano, R.F., and Siliciano, J.D. (2004). Resting CD4+ T Cells from Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Infected Individuals Carry Integrated HIV-1 Genomes within Actively Transcribed Host Genes. *Journal of Virology* 78, 6122-6133.
- Hashimoto, S., and Egly, J.M. (2009). Trichothiodystrophy view from the molecular basis of DNA repair/transcription factor TFIIH. *Hum Mol Genet* 18, R224-R230.
- Hazuda, D.J., Felock, P., Witmer, M., Wolfe, A., Stillmock, K., Grobler, J.A., Espeseth, A., Gabryelski, L., Schleif, W., Blau, C., *et al.* (2000). Inhibitors of Strand Transfer That Prevent Integration and Inhibit HIV-1 Replication in Cells. *Science* 287, 646-650.
- He, Y., Fang, J., Taatjes, D.J., and Nogales, E. (2013). Structural visualization of key steps in human transcription initiation. *Nature* 495, 481-486.
- He, Y., Yan, C., Fang, J., Inouye, C., Tjian, R., Ivanov, I., and Nogales, E. (2016). Near-atomic resolution visualization of human transcription promoter opening. *Nature* 533, 359-365.
- Hendrix, C.W., Flexner, C., MacFarland, R.T., Giandomenico, C., Fuchs, E.J., Redpath, E., Bridger, G., and Henson, G.W. (2000). Pharmacokinetics and Safety of AMD-3100, a Novel Antagonist of the CXCR-4 Chemokine Receptor, in Human Volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44, 1667-1673.
- Herrada, A.A., Contreras, F.J., Marini, N.P., Amador, C.A., González, P.A., Cortés, C.M., Riedel, C.A., Carvajal, C.A., Figueroa, F., Michea, L.F., *et al.* (2010). Aldosterone Promotes Autoimmune Damage by Enhancing Th17-Mediated Immunity. *The Journal of Immunology* 184, 191-202.
- Hirsch, V.M., Dapolito, G., Goeken, R., and Campbell, B.J. (1995). Phylogeny and natural history of the primate lentiviruses, SIV and HIV. *Current Opinion In Genetics & Development* 5, 798-806.
- Hirsch, V.M., Olmsted, R.A., Murphey-Corb, M., Purcell, R.H., and Johnson, P.R. (1989). An African primate lentivirus (SIVsmclosely related to HIV-2. *Nature* 339, 389-392.
- Holstege, F.C., van der Vliet, P.C., and Timmers, H.T. (1996). Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *The EMBO Journal* 15, 1666-1677.
- Hoque, M., Tian, B., Mathews, M.B., and Pe'ery, T. (2005). Granulin and Granulin Repeats Interact with the Tat-P-TEFb Complex and Inhibit Tat Transactivation. *Journal of Biological Chemistry* 280, 13648-13657.

- Hostetler, K.Y., Richman, D.D., Forssen, E.A., Selk, L., Basava, R., Gardner, M.F., Parker, S., and Basava, C. (1994). Phospholipid prodrug inhibitors of the HIV protease. *Biochemical Pharmacology* *48*, 1399-1404.
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., and Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* *474*, 658-661.
- Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G., and Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* *345*, 356-359.
- Iben, S., Tschochner, H., Bier, M., Hoogstraten, D., Hozák, P., Egly, J.-M., and Grummt, I. (2002). TFIIF Plays an Essential Role in RNA Polymerase I Transcription. *Cell* *109*, 297-306.
- Ishaq, M., Hu, J., Wu, X., Fu, Q., Yang, Y., Liu, Q., and Guo, D. (2008). Knockdown of cellular RNA helicase DDX3 by short hairpin RNAs suppresses HIV-1 viral replication without inducing apoptosis. *Mol Biotechnol* *39*, 231 - 238.
- Ito, S. (2010). MMXD, a TFIIF-independent XPD–MMS19 protein complex involved in chromosome segregation. *Mol Cell* *39*, 632-640.
- Jaitovich-Groisman, I., Benlimame, N., Slagle, B.L., Hernandez-Perez, M., Alpert, L., Song, D.J., Fotouhi-Ardakani, N., Galipeau, J., and Alaoui-Jamali, M.A. (2001). Transcriptional regulation of the TFIIF transcription-repair components XPB and XPD by the hepatitis B virus x protein in liver cells and transgenic liver tissue. *Journal of Biological Chemistry*.
- Johnson, R.T., and Squires, S. (1992). The XPD complementation group. *Mutation Research/DNA Repair* *273*, 97-118.
- KAGAWA, C.M., CELLA, J.A., and VAN ARMAN, C.G. (1957). Action of New Steroids in Blocking Effects of Aldosterone and Deoxycorticosterone on Salt. *Science* *126*, 1015-1016.
- Kalantari, P., Narayan, V., Henderson, A.J., and Prabhu, K.S. (2009). 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 inhibits HIV-1 transactivating protein, Tat, through covalent modification. *The FASEB Journal* *23*, 2366-2373.
- Kane, M., Yadav, S.S., Bitzegeio, J., Kutluay, S.B., Zang, T., Wilson, S.J., Schoggins, J.W., Rice, C.M., Yamashita, M., Hatzioannou, T., *et al.* (2013). MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection. *Nature* *502*, 563-566.
- Kashanchi, F., and Brady, J.N. (2005). Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene* *24*, 5938-5951.
- Keele, B.F., Tazi, L., Gartner, S., Liu, Y., Burgon, T.B., Estes, J.D., Thacker, T.C., Crandall, K.A., McArthur, J.C., and Burton, G.F. (2008). Characterization of the Follicular Dendritic Cell Reservoir of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology* *82*, 5548-5561.
- Keen, N.J., Gait, M.J., and Karn, J. (1996). Human immunodeficiency virus type-1 Tat is an integral component of the activated transcription-elongation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 2505-2510.

- Kelly, J., Beddall, M.H., Yu, D.Y., Iyer, S.R., Marsh, J.W., and Wu, Y.T. (2008). Human macrophages support persistent transcription from unintegrated HIV-1 DNA. *Virology* 372.
- Kelso, T.W.R., Baumgart, K., Eickhoff, J., Albert, T., Antrecht, C., Lemcke, S., Klebl, B., and Meisterernst, M. (2014). Cyclin-Dependent Kinase 7 Controls mRNA Synthesis by Affecting Stability of Preinitiation Complexes, Leading to Altered Gene Expression, Cell Cycle Progression, and Survival of Tumor Cells. *Molecular and Cellular Biology* 34, 3675-3688.
- Kempf, D.J., Marsh, K.C., Kumar, G., Rodrigues, A.D., Denissen, J.F., McDonald, E., Kukulka, M.J., Hsu, A., Granneman, G.R., Baroldi, P.A., *et al.* (1997). Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 654-660.
- Kiernan, R.E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K.T., *et al.* (1999). HIV-1 Tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *The EMBO Journal* 18, 6106-6118.
- Klauber, N., Browne, F., Anand-Apte, B., and D'Amato, R.J. (1996). New Activity of Spironolactone: Inhibition of Angiogenesis In Vitro and In Vivo. *Circulation* 94, 2566-2571.
- Kolla, V., and Litwack, G. (2000). Transcriptional regulation of the human NA/K ATPase via the human mineralocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Biochemistry* 204, 35-40.
- Krebs, R., Immendörfer, U., Thrall, S.H., Wöhrl, B.M., and Goody, R.S. (1997). Single-Step Kinetics of HIV-1 Reverse Transcriptase Mutants Responsible for Virus Resistance to Nucleoside Inhibitors Zidovudine and 3-TC. *Biochemistry* 36, 10292-10300.
- Kuiken C.L., F., B., Hahn, B.H., Marx, P., McCutchan, F.E., Mellors, J., Mullins, J., Wolinsky, S. and Korber, B. (1999). A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. In *Human Retroviruses and AIDS (Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, NM.)*.
- Kuritzkes, D.R. (2009). HIV-1 Entry Inhibitors: An Overview. *Current opinion in HIV and AIDS* 4, 82-87.
- Kwiatkowski, N., Zhang, T., Rahl, P.B., Abraham, B.J., Reddy, J., Ficarro, S.B., Dastur, A., Amzallag, A., Ramaswamy, S., Tesar, B., *et al.* (2014). Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature* 511, 616-620.
- Laguette, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Segéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474, 654-657.
- Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., *et al.* (2012). SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol* 13, 223-228.
- Lainé, J.P., and Egly, J.M. (2006). Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 25, 387-397.
- Lapham, C.K., Ouyang, J., Chandrasekhar, B., Nguyen, N.Y., Dimitrov, D.S., and Golding, H. (1996). Evidence for Cell-Surface Association Between Fusin and the CD4-gp120 Complex in Human Cell Lines. *Science* 274, 602-605.

- Laspia, M.F., Rice, A.P., and Mathews, M.B. (1989). HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* 59.
- Le Douce, V., Ait-Amar, A., Forouzan Far, F., Fahmi, F., Quiel, J., El Mekdad, H., Daouad, F., Marban, C., Rohr, O., and Schwartz, C. (2016). Improving combination antiretroviral therapy by targeting HIV-1 gene transcription. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 1-14.
- Le May, N. (2010). NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Mol Cell* 38, 54-66.
- Le May, N., Dubaele, S., De Santis, L.P., Billecocq, A., Bouloy, M., and Egly, J.-M. (2004). TFIIH Transcription Factor, a Target for the Rift Valley Hemorrhagic Fever Virus. *Cell* 116, 541-550.
- Lehmann, A.R. (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 85, 1101-1111.
- Lemey, P., Pybus, O.G., Wang, B., Saksena, N.K., Salemi, M., and Vandamme, A.M. (2003). Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci USA* 100.
- Lewinski, M.K., Bisgrove, D., Shinn, P., Chen, H., Hoffmann, C., Hannehalli, S., Verdin, E., Berry, C.C., Ecker, J.R., and Bushman, F.D. (2005). Genome-Wide Analysis of Chromosomal Features Repressing Human Immunodeficiency Virus Transcription. *Journal of Virology* 79, 6610-6619.
- Lin, P.-F., Blair, W., Wang, T., Spicer, T., Guo, Q., Zhou, N., Gong, Y.-F., Wang, H.-G.H., Rose, R., Yamanaka, G., *et al.* (2003). A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 11013-11018.
- Lin, Y.C., Choi, W.S., and Gralla, J.D. (2005). TFIIH XPB mutants suggest a unified bacterial-like mechanism for promoter opening but not escape. *Nat Struct Mol Biol* 12, 603-607.
- Liu, S.-Y., Aliyari, R., Chikere, K., Li, G., Marsden, Matthew D., Smith, Jennifer K., Pernet, O., Guo, H., Nusbaum, R., Zack, Jerome A., *et al.* (2013). Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol. *Immunity* 38, 92-105.
- Lombès, M., Binart, N., Delahaye, F., Baulieu, E.E., and Rafestin-Oblin, M.E. (1994). Differential intracellular localization of human mineralocorticosteroid receptor on binding of agonists and antagonists. *Biochemical Journal* 302, 191-197.
- Lorgeoux, R.-P., Guo, F., and Liang, C. (2012). From promoting to inhibiting: diverse roles of helicases in HIV-1 Replication. *Retrovirology* 9, 79.
- Losel, R., and Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 46-55.
- Lu, H., Zawel, L., Fisher, L., Egly, J.-M., and Reinberg, D. (1992). Human general transcription factor IIF phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* 358, 641-645.
- Luo, J., Cimermancic, P., Viswanath, S., Ebmeier, Christopher C., Kim, B., Dehecq, M., Raman, V., Greenberg, Charles H., Pellarin, R., Sali, A., *et al.* (2015). Architecture of the Human and Yeast General Transcription and DNA Repair Factor TFIIF. *Molecular Cell* 59, 794-806.

- Lyerly, H.K., Cohen, O.J., and Weinhold, K.J. (1987). Transmission of HIV by Antigen Presenting Cells During T-Cell Activation: Prevention by 3'-Azido-3'-Deoxythymidine. *AIDS Research and Human Retroviruses* 3, 87-94.
- Makino, Y., Yamano, K., Kanemaki, M., Morikawa, K., Kishimoto, T., Shimbara, N., Tanaka, K., and Tamura, T.-a. (1997). SUG1, a Component of the 26 S Proteasome, Is an ATPase Stimulated by Specific RNAs. *Journal of Biological Chemistry* 272, 23201-23205.
- Malim, M.H., and Bieniasz, P.D. (2012). HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2.
- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.-Y., Maizel, J.V., and Cullen, B.R. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338, 254-257.
- Mancebo, H., Lee, G., Flygare, J., Tomassini, J., Luu, P., Zhu, Y., Peng, J., Blau, C., Hazuda, D., Price, D., *et al.* (1997). P-TEFb kinase is required for HIV Tat transcriptional activation in vivo and in vitro. *Genes Dev* 11, 2633 - 2644.
- Mangeat, B., Turelli, P., Caron, G., Friedli, M., Perrin, L., and Trono, D. (2003). Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424, 99-103.
- Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., Traore, I., Hsieh, C., Dia, M., Gueye, E., *et al.* (1994). Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 265, 1587-1590.
- Maron, B.A., and Leopold, J.A. (2008). Mineralocorticoid receptor antagonists and endothelial function. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* 9, 963-969.
- Marshall, N.F., Peng, J., Xie, Z., and Price, D.H. (1996). Control of RNA Polymerase II Elongation Potential by a Novel Carboxyl-terminal Domain Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 271, 27176-27183.
- Masilamani, S., Kim, G.-H., Mitchell, C., Wade, J.B., and Knepper, M.A. (1999). Aldosterone-mediated regulation of ENaC α , β , and γ subunit proteins in rat kidney. *Journal of Clinical Investigation* 104, R19-R23.
- Masutani, C., Sugawara, K., Yanagisawa, J., Sonoyama, T., Ui, M., Enomoto, T., Takio, K., Tanaka, K., van der Spek, P.J., and Bootsma, D. (1994). Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23. *The EMBO Journal* 13, 1831-1843.
- Mavankal, G., Ignatius Ou, S.H., Oliver, H., Sigman, D., and Gaynor, R.B. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 and 2 Tat proteins specifically interact with RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2089-2094.
- McElrath, M.J., Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1991). Latent HIV-1 infection in enriched populations of blood monocytes and T cells from seropositive patients. *The Journal of Clinical Investigation* 87, 27-30.

- McNeely, M., Hendrix, J., Busschots, K., Boons, E., Deleersnijder, A., Gerard, M., Christ, F., and Debyser, Z. (2011). In Vitro DNA Tethering of HIV-1 Integrase by the Transcriptional Coactivator LEDGF/p75. *Journal of Molecular Biology* 410, 811-830.
- Melikyan, G.B., Markosyan, R.M., Hemmati, H., Delmedico, M.K., Lambert, D.M., and Cohen, F.S. (2000). Evidence That the Transition of HIV-1 Gp41 into a Six-Helix Bundle, Not the Bundle Configuration, Induces Membrane Fusion. *The Journal of Cell Biology* 151, 413-424.
- Mellon, I., Spivak, G., and Hanawalt, P.C. (1987). Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell* 51, 241-249.
- Michel, F., Crucifix, C., Granger, F., Eiler, S., Mouscadet, J.F., Korolev, S., Agapkina, J., Ziganshin, R., Gottikh, M., Nazabal, A., *et al.* (2009). Structural basis for HIV-1 DNA integration in the human genome, role of the LEDGF/P75 cofactor. *The EMBO Journal* 28, 980-991.
- Mikkelsen, M., Sønder, S.U., Nersting, J., and Bendtzen, K. (2006). Spironolactone induces apoptosis in human mononuclear cells. Association between apoptosis and cytokine suppression. *Apoptosis* 11, 573-579.
- Mitchell, R.S., Beitzel, B.F., Schroder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C.C., Ecker, J.R., and Bushman, F.D. (2004). Retroviral DNA Integration: ASLV, HIV, and MLV Show Distinct Target Site Preferences. *PLoS Biol* 2, e234.
- Moreland, R.J., Tirode, F., Yan, Q., Conaway, J.W., Egly, J.-M., and Conaway, R.C. (1999). A Role for the TFIIH XPB DNA Helicase in Promoter Escape by RNA Polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* 274, 22127-22130.
- Mousseau, G., Clementz, Mark A., Bakeman, Wendy N., Nagarsheth, N., Cameron, M., Shi, J., Baran, P., Fromentin, R., Chomont, N., and Valente, Susana T. (2012). An Analog of the Natural Steroidal Alkaloid Cortistatin A Potently Suppresses Tat-Dependent HIV Transcription. *Cell Host & Microbe* 12, 97-108.
- Mousseau, G., Kessing, C.F., Fromentin, R., Trautmann, L., Chomont, N., and Valente, S.T. (2015a). The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *mBio* 6, e00465-00415.
- Mousseau, G., Mediouni, S., and Valente, S.T. (2015b). Targeting HIV Transcription: The Quest for a Functional Cure. *Current topics in microbiology and immunology* 389, 121-145.
- Muriaux, D., Mirro, J., Harvin, D., and Rein, A. (2001). RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 5246-5251.
- Nance, M.A., and Berry, S.A. (1992). Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet* 84, 42-68.
- Narayan, V., Ravindra, K.C., Chiaro, C., Cary, D., Aggarwal, B.B., Henderson, A.J., and Prabhu, K.S. (2011). Celastrol Inhibits Tat-Mediated Human Immunodeficiency Virus (HIV) Transcription and Replication. *Journal of Molecular Biology* 410, 972-983.
- Neil, S.J.D., Zang, T., and Bieniasz, P.D. (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425-430.

- Ng, J.M.Y., Vermeulen, W., van der Horst, G.T.J., Bergink, S., Sugasawa, K., Vrieling, H., and Hoeijmakers, J.H.J. (2003). A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein. *Genes & Development* *17*, 1630-1645.
- Nilson, K.A., and Price, D.H. (2011). The Role of RNA Polymerase II Elongation Control in HIV-1 Gene Expression, Replication, and Latency. *Genetics Research International* *2011*, 726901.
- Nospikel, T. (2009). DNA Repair in Mammalian Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* *66*, 994-1009.
- Ohkuma, Y., and Roeder, R.G. (1994). Regulation of TFIIF ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature* *368*, 160-163.
- Oksenysh, V., de Jesus, B.B., Zhovmer, A., Egly, J.M., and Coin, F. (2009). Molecular insights into the recruitment of TFIIF to sites of DNA damage, Vol 28.
- Oler, A.J. (2010). Human RNA polymerase III transcriptomes and relationships to Pol II promoter chromatin and enhancer-binding factors. *Nature Struct Mol Biol* *17*, 620-628.
- Overdiek, H.W.P.M., Hermens, W.A.J.J., and Merkus, F.W.H.M. (1985). New insights into the pharmacokinetics of spironolactone. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* *38*, 469-474.
- Parikh, U.M., Zelina, S., Sluis-Cremer, N., and Mellors, J.W. (2007). Molecular mechanisms of bidirectional antagonism between K65R and thymidine analog mutations in HIV-1 reverse transcriptase. *AIDS* *21*, 1405-1414.
- Peterlin, B.M., and Trono, D. (2003). Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* *3*, 97-107.
- Pettit, S.C., Moody, M.D., Wehbie, R.S., Kaplan, A.H., Nantermet, P.V., Klein, C.A., and Swanstrom, R. (1994). The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *Journal of Virology* *68*, 8017-8027.
- Ping, Y.-H., and Rana, T.M. (1999). Tat-associated Kinase (P-TEFb): a Component of Transcription Preinitiation and Elongation Complexes. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 7399-7404.
- Plaschka, C., Hantsche, M., Dienemann, C., Burzinski, C., Plitzko, J., and Cramer, P. (2016). Transcription initiation complex structures elucidate DNA opening. *Nature* *533*, 353-358.
- Popper, S.J., Sarr, A.D., Guèye-Ndiaye, A., Mboup, S., Essex, M.E., and Kanki, P.J. (2000). Low Plasma Human Immunodeficiency Virus Type 2 Viral Load Is Independent of Proviral Load: Low Virus Production In Vivo. *Journal of Virology* *74*, 1554-1557.
- Popper, S.J., Sarr, A.D., Travers, K.U., Guèye-Ndiaye, A., Mboup, S., Essex, M.E., and Kanki, P.J. (1999). Lower Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 2 Viral Load Reflects the Difference in Pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *Journal of Infectious Diseases* *180*, 1116-1121.
- Qadri, I., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Schaack, J., and Siddiqui, A. (1996). Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, associates with the components of TFIIF and stimulates the DNA helicase activity of TFIIF. *Proc Natl Acad Sci USA* *93*, 10578-10583.

- Qiu, D., Zhao, G., Aoki, Y., Shi, L., Uyei, A., Nazarian, S., Ng, J.C.-H., and Kao, P.N. (1999). Immunosuppressant PG490 (Triptolide) Inhibits T-cell Interleukin-2 Expression at the Level of Purine-box/Nuclear Factor of Activated T-cells and NF- κ B Transcriptional Activation. *Journal of Biological Chemistry* 274, 13443-13450.
- Redel, L., Le Douce, V., Cherrier, T., Marban, C., Janossy, A., Aunis, D., Van Lint, C., Rohr, O., and Schwartz, C. (2010). HIV-1 regulation of latency in the monocyte-macrophage lineage and in CD4+ T lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 87, 575-588.
- Robert-Nicoud, M., Flahaut, M., Elalouf, J.-M., Nicod, M., Salinas, M., Bens, M., Doucet, A., Wincker, P., Artiguenave, F., Horisberger, J.-D., *et al.* (2001). Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: Effects of aldosterone and vasopressin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2712-2716.
- Roberts, N., Martin, J., Kinchington, D., Broadhurst, A., Craig, J., Duncan, I., Galpin, S., Handa, B., Kay, J., Krohn, A., *et al.* (1990). Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science* 248, 358-361.
- Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J.M., and Chambon, P. (1997). Stimulation of RAR α activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* 90, 97-107.
- Rosa, A., Chande, A., Ziglio, S., De Sanctis, V., Bertorelli, R., Goh, S.L., McCauley, S.M., Nowosielska, A., Antonarakis, S.E., Luban, J., *et al.* (2015). HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* 526, 212-217.
- Rosen, C.A., Sodroski, J.G., and Haseltine, W.A. (1985). The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* 41.
- Rossignol, M., Kolb-Cheynel, I., and Egly, J.M. (1997). Substrate specificity of the cdk-activating kinase (CAK) is altered upon association with TFIID. *EMBO J* 16, 1628-1637.
- Roy, B., Hu, J., Guo, X., Russell, R., Guo, F., Kleiman, L., and Liang, C. (2006). Association of RNA helicase a with human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Biol Chem* 281, 12625 - 12635.
- Ruelas, Debbie S., and Greene, Warner C. (2013). An Integrated Overview of HIV-1 Latency. *Cell* 155, 519-529.
- Ruvolo, V., Sun, L., Howard, K., Sung, S., Delecluse, H.-J., Hammerschmidt, W., and Swaminathan, S. (2004). Functional Analysis of Epstein-Barr Virus SM Protein: Identification of Amino Acids Essential for Structure, Transactivation, Splicing Inhibition, and Virion Production. *Journal of Virology* 78, 340-352.
- Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J., Chambon, P., and Egly, J. (1993). DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIID) basic transcription factor. *Science* 260, 58-63.
- Schoggins, J.W., Wilson, S.J., Panis, M., Murphy, M.Y., Jones, C.T., Bieniasz, P., and Rice, C.M. (2011). A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472, 481-485.
- Schröder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2002). HIV-1 Integration in the Human Genome Favors Active Genes and Local Hotspots. *Cell* 110, 521-529.

- Selye, H. (1949). Participation of Adrenal Cortex in Pathogenesis of Arthritis. *British Medical Journal* 2, 1129-1135.
- Serizawa, H., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1993). Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription. *Nature* 363, 371-374.
- Sharma, A., Awasthi, S., Harrod, C., Matlock, E., Khan, S., Xu, L., Chan, S., Yang, H., Thammavaram, C., and Rasor, R. (2007). The Werner syndrome helicase is a cofactor for HIV-1 long terminal repeat transactivation and retroviral replication. *J Biol Chem* 282, 12048 - 12057.
- Sharp, P.M., Bailes, E., Chaudhuri, R.R., Rodenburg, C.M., Santiago, M.O., and Hahn, B.H. (2001). The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356.
- Shedder, E., Wargent, E., Ashton, N., and Balment, R. (2002). Rapid stimulation of cyclic AMP production by aldosterone in rat inner medullary collecting ducts. *Journal of Endocrinology* 175, 343-347.
- Sheehy, A.M., Gaddis, N.C., Choi, J.D., and Malim, M.H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418, 646-650.
- Simpson, S.A., Tait, J.F., Wettstein, A., Neher, R., v. Euw, J., and Reichstein, T. (1953). Isolierung eines neuen kristallisierten Hormons aus Nebennieren mit besonders hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel. *Experientia* 9, 333-335.
- Singh, A., Compe, E., Le May, N., and Egly, J.-M. (2015). TFIIH Subunit Alterations Causing Xeroderma Pigmentosum and Trichothiodystrophy Specifically Disturb Several Steps during Transcription. *The American Journal of Human Genetics* 96, 194-207.
- Smith, D., Byrn, R., Marsters, S., Gregory, T., Gropman, J., and Capon, D. (1987). Blocking of HIV-1 infectivity by a soluble, secreted form of the CD4 antigen. *Science* 238, 1704-1707.
- Sodroski, J., Patarca, R., Rosen, C., Wong-Staal, F., and Haseltine, W. (1985a). Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 229, 74-77.
- Sodroski, J., Rosen, C., Wong-Staal, F., Salahuddin, S., Popovic, M., Arya, S., Gallo, R., and Haseltine, W. (1985b). Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science* 227, 171-173.
- Sønder, S.U.S., Mikkelsen, M., Rieneck, K., Hedegaard, C.J., and Bendtzen, K. (2006a). Effects of spironolactone on human blood mononuclear cells: mineralocorticoid receptor independent effects on gene expression and late apoptosis induction. *British Journal of Pharmacology* 148, 46-53.
- Sønder, S.U.S., Woetmann, A., Ødum, N., and Bendtzen, K. (2006b). Spironolactone induces apoptosis and inhibits NF- κ B independent of the mineralocorticoid receptor. *Apoptosis* 11, 2159-2165.
- Stelzer, A.C., Frank, A.T., Kratz, J.D., Swanson, M.D., Gonzalez-Hernandez, M.J., Lee, J., Andricioaei, I., Markovitz, D.M., and Al-Hashimi, H.M. (2011). Discovery of selective bioactive small molecules by targeting an RNA dynamic ensemble. *Nat Chem Biol* 7, 553-559.

- Stevens, M., De Clercq, E., and Balzarini, J. (2006). The regulation of HIV-1 transcription: Molecular targets for chemotherapeutic intervention. *Medicinal Research Reviews* 26, 595-625.
- Stremlau, M., Owens, C.M., Perron, M.J., Kiessling, M., Autissier, P., and Sodroski, J. (2004). The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427.
- Stremlau, M., Perron, M., Lee, M., Li, Y., Song, B., Javanbakht, H., Diaz-Griffero, F., Anderson, D.J., Sundquist, W.I., and Sodroski, J. (2006). Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 α restriction factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 5514-5519.
- Strizki, J.M., Tremblay, C., Xu, S., Wojcik, L., Wagner, N., Gonsiorek, W., Hipkin, R.W., Chou, C.-C., Pugliese-Sivo, C., Xiao, Y., *et al.* (2005). Discovery and Characterization of Vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 Antagonist with Potent Activity against Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 4911-4919.
- Studamire, B., and Goff, S. (2008). Host proteins interacting with the Moloney murine leukemia virus integrase: multiple transcriptional regulators and chromatin binding factors. *Retrovirology* 5, 48.
- Sugasawa, K. (2001). A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair. *Genes Dev* 15, 507-521.
- Swaffield, J.C., Bromberg, J.F., and Johnston, S.A. (1992). Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4. *Nature* 357, 698-700.
- Tabarrini, O., Massari, S., Sancineto, L., Daelemans, D., Sabatini, S., Manfroni, G., Cecchetti, V., and Pannecouque, C. (2011). Structural Investigation of the Naphthyridone Scaffold: Identification of a 1,6-Naphthyridone Derivative with Potent and Selective Anti-HIV Activity. *ChemMedChem* 6, 1249-1257.
- Taylor, E.M., Broughton, B.C., Botta, E., Stefanini, M., Sarasin, A., Jaspers, N.G.J., Fawcett, H., Harcourt, S.A., Arlett, C.F., and Lehmann, A.R. (1997). Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy are associated with different mutations in the XPD (ERCC2) repair/transcription gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 8658-8663.
- Thierry, S., Munir, S., Thierry, E., Subra, F., Leh, H., Zamborlini, A., Saenz, D., Levy, D.N., Lesbats, P., Saïb, A., *et al.* (2015). Integrase inhibitor reversal dynamics indicate unintegrated HIV-1 dna initiate de novo integration. *Retrovirology* 12, 1-12.
- Tirode, F., Busso, D., Coin, F., and Egly, J.-M. (1999). Reconstitution of the Transcription Factor TFIIH: Assignment of Functions for the Three Enzymatic Subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Molecular Cell* 3, 87-95.
- Titov, D.V., Gilman, B., He, Q.-L., Bhat, S., Low, W.-K., Dang, Y., Smeaton, M., Demain, A.L., Miller, P.S., Kugel, J.F., *et al.* (2011). XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nat Chem Biol* 7, 182-188.
- Tong, X., Drapkin, R., Reinberg, D., and Kieff, E. (1995). The 62- and 80-kDa subunits of transcription factor IIH mediate the interaction with Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3259-3263.

- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J.M., Olson, W.C., Allaway, G.P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P.J., and Moore, J.P. (1996). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384, 184-187.
- Turner, S., Tizard, R., DeMarinis, J., Pepinsky, R.B., Zullo, J., Schooley, R., and Fisher, R. (1992). Resistance of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 to neutralization by soluble CD4 is not due to lower affinity with the viral envelope glycoprotein gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 1335-1339.
- Usami, Y., Wu, Y., and Gottlinger, H.G. (2015). SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 526, 218-223.
- Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R.L., Mitchell, R., Johnson, M.C., Stephens, E.B., and Guatelli, J. (2008). The Interferon-Induced Protein BST-2 Restricts HIV-1 Release and Is Downregulated from the Cell Surface by the Viral Vpu Protein. *Cell Host & Microbe* 3, 245-252.
- van der Loeff, M.F.S., Larke, N., Kaye, S., Berry, N., Ariyoshi, K., Alabi, A., van Tienen, C., Leligidowicz, A., Sarge-Njie, R., da Silva, Z., *et al.* (2010). Undetectable plasma viral load predicts normal survival in HIV-2-infected people in a West African village. *Retrovirology* 7, 1-10.
- van Hoffen, A., Natarajan, A.T., Mayne, L.V., Zeeland, A.A.v., Mullenders, L.H.F., and Venema, J. (1993). Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells. *Nucleic Acids Research* 21, 5890-5895.
- Verma, D., Thompson, J., and Swaminathan, S. (2016). Spironolactone blocks Epstein–Barr virus production by inhibiting EBV SM protein function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 3609-3614.
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F., *et al.* (1998). DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes & Development* 12, 343-356.
- Wagner, C.A., Ott, M., Klingel, K., Beck, S., Friedrich, B., Wild, K.N., Bröer, S., Moschen, I., Albers, A., Waldegger, S., *et al.* (2001). Effects of the Serine/Threonine Kinase SGK1 on the Epithelial Na⁺ Channel (ENaC) and CFTR: Implications for Cystic Fibrosis. *Cellular Physiology and Biochemistry* 11, 209-218.
- Wan, Z., and Chen, X. (2014). Triptolide inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting proteasomal degradation of Tat protein. *Retrovirology* 11, 88.
- Wang, Y., Lu, J.-j., He, L., and Yu, Q. (2011). Triptolide (TPL) Inhibits Global Transcription by Inducing Proteasome-Dependent Degradation of RNA Polymerase II (Pol II). *PLoS ONE* 6, e23993.
- Weber, C.A., Salazar, E.P., Stewart, S.A., and Thompson, L.H. (1990). ERCC2: cDNA cloning and molecular characterization of a human nucleotide excision repair gene with high homology to yeast RAD3. *The EMBO Journal* 9, 1437-1447.
- Weeda, G., Ma, L.B., van Ham, R.C., van der Eb, A.J., and Hoeijmakers, J.H. (1991). Structure and expression of the human XPBC/ERCC-3 gene involved in DNA repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Nucleic Acids Research* 19, 6301-6308.

- Weeda, G., Rossignol, M., Fraser, R.A., Winkler, G.S., Vermeulen, W., van't Veer, L.J., Ma, L., Hoeijmakers, J.H.J., and Egly, J.-M. (1997). The XPB subunit of repair/transcription factor TFIIH directly interacts with SUG1, a subunit of the 26S proteasome and putative transcription factor. *Nucleic Acids Research* *25*, 2274-2283.
- Weeda, G., van Ham, R.C.A., Vermeulen, W., Bootsma, D., van der Eb, A.J., and Hoeijmakers, J.H.J. (1990). A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell* *62*, 777-791.
- Wild, C.T., Shugars, D.C., Greenwell, T.K., McDanal, C.B., and Matthews, T.J. (1994). Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 9770-9774.
- Wu, H., Myszka, D.G., Tendian, S.W., Brouillette, C.G., Sweet, R.W., Chaiken, I.M., and Hendrickson, W.A. (1996). Kinetic and structural analysis of mutant CD4 receptors that are defective in HIV gp120 binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *93*, 15030-15035.
- Wyatt, R., and Sodroski, J. (1998). The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens. *Science* *280*, 1884-1888.
- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., Reinberg, D., Flores, O., and Ingles, C.J. (1994). Binding of basal transcription factor TFIIH to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Molecular and Cellular Biology* *14*, 7013-7024.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. (1999). NELF, a Multisubunit Complex Containing RD, Cooperates with DSIF to Repress RNA Polymerase II Elongation. *Cell* *97*, 41-51.
- Ye, P., Liu, S., Zhu, Y., Chen, G., and Gao, G. (2010). DEXH-Box protein DHX30 is required for optimal function of the zinc-finger antiviral protein. *Protein & Cell* *1*, 956-964.
- Yedavalli, V.S.R.K., Neuveut, C., Chi, Y.-h., Kleiman, L., and Jeang, K.-T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD Box RNA Helicase for HIV-1 Rev-RRE Export Function. *Cell* *119*, 381-392.
- Yoder, K., Espeseth, A., Wang, X., Fang, Q., Russo, M., Lloyd, R., Hazuda, D., Sobol, R., and Fishel, R. (2011). The base excision repair pathway is required for efficient lentivirus integration. *PLoS One* *6*, e17862.
- Yoder, K., Sarasin, A., Kraemer, K., McIlhatton, M., Bushman, F., and Fishel, R. (2006). The DNA repair genes XPB and XPD defend cells from retroviral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 4622-4627.
- Zack, J.A., Arrigo, S.J., Weitsman, S.R., Go, A.S., Haislip, A., and Chen, I.S.Y. (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: Molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* *61*, 213-222.
- Zhou, H., Xu, M., Huang, Q., Gates, A., Zhang, X., Castle, J., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Hazuda, D., *et al.* (2008a). Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* *4*, 495 - 504.

- Zhou, M., Halanski, M.A., Radonovich, M.F., Kashanchi, F., Peng, J., Price, D.H., and Brady, J.N. (2000). Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol and Cell Biol* 20.
- Zhou, M., Nekhai, S., Bharucha, D.C., Kumar, A., Ge, H., Price, D.H., Egly, J.-M., and Brady, J.N. (2001). TFIIF Inhibits CDK9 Phosphorylation during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 276, 44633-44640.
- Zhou, Y., Ma, J., Bushan Roy, B., Wu, J., Pan, Q., Rong, L., and Liang, C. (2008b). The packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA is restricted by overexpression of an RNA helicase DHX30. *Virology* 372, 97 - 106.
- Zhu, T., Muthui, D., Holte, S., Nickle, D., Feng, F., Brodie, S., Hwangbo, Y., Mullins, J.I., and Corey, L. (2002). Evidence for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication In Vivo in CD14+ Monocytes and Its Potential Role as a Source of Virus in Patients on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Journal of Virology* 76, 707-716.
- Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M., and Price, D. (1997). Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 tat transactivation in vitro. *Genes Dev* 11, 2622 - 2632.

ANNEXES

Protocol for ChIP experiments

Cells were harvested with a scraper, washed twice in PBS, and fixed in PBS – 1% formaldehyde 10 minutes at room temperature. Formaldehyde was neutralized by adding glycine at 125 mM final concentration for 2 minutes. Fixed cells were extensively washed in cold PBS.

Nuclei were isolated by resuspending cells into cell lysis buffer (Hepes pH 7.8 25 mM, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM, NP-40 0.1%), incubated 10 min on ice followed by centrifugation (5 minutes, 2000 rpm). Nuclei were resuspended in nuclear lysis buffer (Hepes pH 7.9 50 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X100 1%, Na-deoxycholate 0.1%, SDS 0.5%), and sonicated on bioruptor to obtain 200 to 500 bp DNA fragments. Following centrifugation (10 min, 13000 rpm) the supernatant was used for immunoprecipitation.

Immunoprecipitation was performed by preparing antibodies-beads complexes prior to mixing with the chromatin. Protein-A/G beads (Thermo Fisher Scientific, 88802) were incubated at 4°C for 4 hours with 5 µg antibodies against p-Ser 5 Pol II Millipore, 04-1572), or 5 µg of IgG. Antibody-beads complexes were then incubated overnight with 5 to 20 µg of chromatin in IP buffer (Hepes pH 7.9 50 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Triton X100 1%).

Immunoprecipitates were washed three times with IP buffer, one time with wash buffer (Tris pH 8 20 mM, LiCl 250 mM, EDTA 1 mM, NP-40 0.5%, Na-deoxycholate 0.5%), and two times with elution buffer (Tris pH 8 20 mM, EDTA 1 mM). Then immunoprecipitated chromatin was eluted by incubating beads with extraction buffer supplemented with 1% SDS at 65°C.

Chromatin was then reverse cross-linked by adding NaCl (200 mM) and RnaseA (0.3 µg/µL) and incubating whole night at 65°C. The proteins were digested by adding Proteinase K (0.2 µg/µL) and incubating 4 hours at 37°C. Finally, DNA was purified with phenol-chloroform.

We analyzed the ChIP data by real-time qPCR. The primers used are as followed : negative control region (intergenic region), GAA GTG GAC GGA AGA ATG GA and CTG ACT CCCGCT TCA TTG AT ; positive control region (GAPDH), CCG GGA GAA GCT GAG TCA TG and TTT GCG GTG GAA ATG TCC TT ; LTR, ACA CAA GGC TAC TTC CCT GAT and TGG CTC AAC TGG TAC TAG CT ; TSS, CAG CTG CTT TTT GCC TGT ACT G and TCC ACA CTG ACT AAA AGG GTC TGA.

Caractérisation moléculaire de l'inhibition de la transcription du VIH dépendante de Tat par la Spironolactone

La spironolactone (SP), est un antagoniste de l'aldostérone, utilisée dans le traitement de l'hypertension. Le traitement de cellules par la SP induit la dégradation spécifique de la protéine XPB (*Alekseev et al.*, 2014). L'utilisation de la SP sur des lignées lymphocytaires (Jurkat T) et des lymphocytes primaires issus du sang (CD4+ activées), préalablement infectées par le VIH (type 1 ou type 2), entraîne une forte dégradation de la protéine XPB et une inhibition importante de l'infection virale. Pour confirmer la spécificité de la spironolactone sur la réplication du VIH, nous avons utilisé en parallèle l'éplérénone, analogue structurale de la spironolactone incapable de dégrader la protéine XPB. A contrario, lorsque l'on traite les cellules avec l'éplérénone, l'infection virale n'est pas inhibée. Par ailleurs, le traitement par la spironolactone a mis en évidence un effet sur l'activation de la transcription du promoteur LTR du VIH dépendante de Tat, effet qui n'est pas observé si le LTR est activé via des voies alternes (PMA et TNF). La quantification des ARN cellulaires et viraux a montré le rôle spécifique de l'action de la SP sur la transcription du promoteur LTR en présence de la protéine Tat. La spironolactone est incapable d'inhiber la transcription de promoteurs viraux différents du LTR du VIH. La spironolactone est également capable d'inhiber la réactivation de la transcription à partir du LTR du VIH dans un modèle contenant un provirus latent. Cette molécule ouvre de nouvelles perspectives concernant les molécules inhibitrices de la transcription virale et met en lumière le rôle de cofacteur de la protéine XPB dans l'infection par le VIH.

Mots-clés : VIH, spironolactone, XPB, LTR, transcription

Spironolactone (SP) is an aldosterone antagonist used in hypertension treatment for many years. SP treatment is responsible for a rapid and specific degradation of the XPB protein (*Alekseev et al.*, 2014). Jurkat and primary CD4 + T cells infected by HIV-1 or HIV-2 and treated by SP show a strong degradation of the XPB protein and an important inhibition of viral infection. To confirm specificity of SP action on HIV, we have used a structural analogue of SP, Eplerenone (EPL), which can't degrade XPB. On the contrary, EPL is unable to inhibit infection of cells previously infected by HIV. Otherwise, SP inhibition of HIV seems to be specific of Tat dependent transcription from the HIV promoter, because activation of this promoter with PMA or TNF is not affected by SP. Quantification of viral and cellular RNA show that only LTR transcription is affected by SP. Transcription of other promoters was measured in presence of SP and Tat but no inhibition of gene transcription has been observed. Finally, SP is also able to inhibit HIV LTR reactivation from latently infected T cells. This drug appears as a new anti-HIV compound and gives new perspectives concerning transcriptional inhibitors of HIV replication. This molecule also highlights the cofactor role of XPB during HIV replication in natural target cells.

Keywords : HIV, spironolactone, XPB, LTR, transcription