

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

**DEVELOPPEMENT D'INHIBITEURS DE LA DIMERISATION
DU COMPLEXE DE LA REVERSE TRANSCRIPTION DU
VIH-1**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Biochimie Biologie Moléculaire et Biophysique

Formation Doctorale : Biologie-Santé

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé CBS²

Vendredi 7 juin 2013

Par

MOUSTAPHA ABBA MOUSSA Daouda

Devant la commission d'examen formée de :

M. le Pr. Stephen BAGHDIGUIAN	Membre
M. le Dr. Pascal CLAYETTE	Membre
M. le Pr. Philippe COTELLE	Membre/Rapporteur
M. le Dr. Roland MARQUET	Membre/Rapporteur
M. le Dr. Gilles DIVITA	Directeur de thèse

A mes parents, à ma famille,

Sommaire	3
Introduction générale	15
I Historique et épidémiologie de l'infection du virus d'immunodéficience humaine VIH	15
I-1 Chronologie des rétrovirus et découverte du VIH	16
I-2 Epidémiologie	19
II Le virus de l'immunodéficience humaine	19
II-1 Classification des rétrovirus	19
II-1.1 Les Spumavirus	19
II-1.2 Les Oncovirus	19
II-1.3 Les Lentivirus	20
II-2 Variabilité du VIH	20
II-2.1 Classification de différents types de VIH	21
II-2.2 Mécanismes engendrant la variabilité du virus	22
II-3 Caractéristiques du virus	22
II-3.1 Organisation de la particule virale	22
II-3.2 Organisation du génome	23
II-3.3 Le cycle viral	26
II-3.3.1 Phase précoce du cycle viral	27
- Le complexe de retro-transcription (RTC)	27
- Le complexe de pré-intégration (PIC).....	27
II-3.3.2 Phase tardive de maturation des virions	28
II-4 le tropisme viral	29
II-5 Pathologie du VIH	30
II-5.1 Passage du virus à travers les muqueuses	30
II-5.2 Infection des cellules du système immunitaire	31

II-5.3 Les réservoirs viraux	32
III Les différents stades de la maladie du SIDA	33
III-1 Le stade SIDA et les maladies opportunistes	34
III-2 Le diagnostic	35
IV Thérapie et stratégie préventive	35
IV-1 Les inhibiteurs actuellement utilisés en clinique	36
IV-2 Les inhibiteurs d'entrée du VIH.....	37
IV-3 les inhibiteurs de l'intégration (INIs).....	37
IV-4 Les inhibiteurs de protéase (IPs)	39
IV-5 Les inhibiteurs de la Reverse Transcriptase RT.....	40
La Reverse Transcriptase du VIH-1.....	42
I Mécanisme et fonction de la RT	43
II Processus de reverse transcription.....	45
III Organisation structurale de la RT.....	46
III-1 L'hétéro-dimère RT	48
III-2. Mécanisme fonctionnel de la RT.....	50
III-2.1 La synthèse d'ADN ARN dépendante et ADN dépendante.....	52
III-2.2 Le clivage d'ARN dirigé par l'ADN.....	54
III-2.3 Mécanisme de transfert de brin	55
III-2.4 La pyrophosphorolyse.....	55
IV Les inhibiteurs de la RT (RTIs)	56
IV-1 Les inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques (NRTI/NtRTI)	56
IV-1.1 Les NRTIs : Mécanisme d'action et Résistance	56
IV-1.2 Les Inhibiteurs Nucléotidiques NtRTIs.....	60
IV-1.3 Les Limitations des NRTIs	60
IV-1.4 Les NRTIs en développement	61
IV-2 Les Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la RT (NNRTIs).....	63

IV-2.1 Les NNRTIs actuellement utilisés en clinique.....	65
IV-2.2 les nouveaux NNRTIs	67
IV-2.3 Les inhibiteurs analogues des pyrophosphates PPI	69
IV-3 Les inhibiteurs de la RNase H	70
IV-4 Les doubles inhibiteurs de RNase H et de l'IN	70
IV-5 Les doubles inhibiteurs de la RNase H et de la polymérase	72
IV-6 Les inhibiteurs de la dimérisation de la RT	74
IV-6.1 Mécanisme moléculaire de la dimérisation de la RT.....	74
IV-6.2 Les inhibiteur de la dimérisation de la RT (DimRTIs)	76
IV-6.2.1 Les petites molécules chimiques	76
IV-6.2.2 Les inhibiteurs peptidiques de la RT	77
OJECTIFS.....	79
I Les peptides inhibiteurs de la dimérisation de RT.....	80
II Les peptides inhibiteurs de la maturation de RT	81
III Objectifs	82
III-1 Identification et mécanisme d'action du peptide P_{ID4} : inhibiteur de l'étape de "dimérisation"	82
III-2 Etude du mécanisme d'action du peptide P27 inhibiteur de l'étape de "maturation"	83
Matériels et méthodes	84
I Production et purification de la RT du VIH-1	85
I-1 Les constructions de RT	85
I-1.1 Méthodes.....	85
I-1.1.1 RT étiquetée poly-histidines ($^{His}p66/p51^{His}$)	85
I-1.1.2 Hétérodimère de RT : Coexpression.....	86
II Les peptides synthétiques.....	87
III Mesure de l'activité polymérase de la transcriptase inverse du VIH-1	88
III-1 Test standard d'activité polymérase de la RT	88

III-1.1 Matériels	88
III-1.2 Méthode	88
III-2 Mesure de la cinétique à l'état stationnaire	89
III-2.1 Matériels	89
III-2.2 Méthodes.....	90
IV Les tests antiviraux	90
V Internalisations cellulaires des peptides thérapeutiques : notion de "Cell penetrating peptides (CPPs)"	91
VI Mesure d'interactions	94
VI-1 La Chromatographie d'exclusion de taille	94
VI-2 Interaction spécifique entre RT et peptides marqués à la FITC	94
VI-2 Mesures d'affinité des différents interacteurs de RT par spectroscopie de fluorescence	95
VII Etudes d'interaction par SPR	96
VII-1 Principe	96
VII-2 Mesure d'interaction	97
VII Mesures de la structure par Dichroïsme Circulaire (CD).....	97
Résultats et discussion	99
PARTIE I : Peptides inhibiteurs de la dimerisation de RT	100
I Optimisation de Pep-7	100
I-1 Evaluation du site de fixation par mesure "docking" de Pep-7 sur RT	100
I-2 Etude et optimisation de la séquence de Pep-7	103
I-3 Evaluation anti-polymérase et antivirale des peptides dérivés de Pep-7.....	106
I-3.1 Activité anti-polymérase des peptides dérivés de Pep-7.....	107
I-3.2 Activité antivirale des peptides dérivés de Pep-7	107
I-4 P_{ID4} bloque la dimérisation de la RT	108
II Evaluation antivirale de P_{ID4}	110
II-1 Effet de P_{ID4} sur les isolats des différents sous-types du VIH-1	110

II-2 P_{ID4} inhibe la réplication des souches virales résistantes aux NRTI et NNRTI	111
III Discussion	113
PARTIE II : Peptides inhibiteurs de la maturation de RT	115
I Elaboration du peptide P27 inhibiteur de la maturation de la RT	115
II Mécanisme d'interaction de P27 avec RT	116
II-1 Etude de la séquence de P27	116
II-2 Etude de fixation de P27 sur la RT par la technique de chromatographie	118
II-3 Etude de fixation de P27 sur la RT par spectroscopie de fluorescence	119
II-4 Effet de P27 sur la fixation des substrats de RT	123
II-5 Effet de P27 sur la cinétique de polymérase à l'état pré-stationnaire	125
II-6.1 Etude du site S1 : Mécanisme de P27 par rapport à celui des inhibiteurs non nucléosidiques (NNRTIs)	126
II-6.2 Etude de site de fixation de P27 en comparaison de Paw sur la RT : Le site S2	129
III P27 Inhibe la réplication des souches résistantes aux NRTIs et aux NNRTIs	131
IV Optimisation de P27	132
IV-1 Conception et synthèse chimique de P27 Cyclique	133
IV-2 Etude structurale de P27 Cyclique	136
IV-3 Evaluation de l'activité antipolymérase et antivirale de Cyclique (P27C)	137
IV-4 Etude du mécanisme d'action de P27 Cyclique	138
V Discussion	140
Conclusion/perspectives	144
Annexes	175

Abréviations

3TC	Lamivudine
ABC	Abacavir
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNsb	AND simple brin
ADNdb	ADN double brins
ARN	acide ribonucléique
ARNsb :	ARN simple brin
ARNt ₃ ^{Lys}	isoaccepteur 3 de l'ARN de transfert spécifique de la lysine
ATP	adénosine 5'-triphosphate
AZT	Zidovudine
CAp24	"capsid protein" P24
CCR5	"CC-chemokine receptor"5
CXCR4	"CXC-chemokine receptor
CD	"Circular Dichroïsm"
CD4	"cluster of differentiation" 4
CD 4i	CD4 induit
CDC	"Center of Disease Controlé"
CMH-I	complexe Majeur d'histocompatibilité classe 1
CMV	cytomégalovirus
CPA	cellules présentatrices d'antigènes
d4T	Stavudine,
DAPD	Amdoxovir
DC	cellules dendritiques
DC-SIGN	"Dendritic Cell Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin"
ddC	Zalcitabine,
ddl	Didanosine
DKA	dérivé d'acide 4-aryl-2,4-diketobutanoic
dNTP	2'-désoxyribonucléotide 5'-triphosphate
DTG	Dolutegravir
DXG	1-β-D-dioxolone guanosine
EFV	Efavirenz
Env	enveloppe

EVG	Elvitegravir
FTC	Emtricitabine,
gag	"group specific antigen"
gp	glycoprotéine
HAART	"Highly Active Antiretroviral Therapy"
HS	Héparane sulfate
HTLV-I	Human T-Cell Leukemia Virus I
IN	intégrase
INIs	inhibiteurs de l'intégration
IPs	inhibiteurs de protéase
IS	indice de sélectivité
Kac	constante d'activation
Kass	constante d'association
Kd	constante d'équilibre de dissociation
Ki	constante d'inhibition
LAV-1	"Lymphadenopathy Associated Virus"
LC	cellules de Langerhans
LTR	"long terminal repeat"
MuLV	irus de la leucémie murine de Moloney
NC	nucléocapside virale
nef	"negative regulation factor"
NK	"Natural Killer"
NKT	"Natural Killer T cells"
NSI	" non-syncitium-inducing"
NRTI	Inhibiteur nucléosidique de la RT
NNRTI	Inhibiteur non nucléosidiques de la RT
p/t	"primer/template"
PBS	"Primer Binding Site"
PFA	phosphonoformiate
PIC	complexe de pré-intégration
pol	polymérase
PPi	pyrophosphate
PPT	"PolyPurine Tracts"
RAL	Raltégravir

RCV	Racivir
rev	"regulator of viral expression"
RHRTIs	inhibiteurs de RNase-H
RT	Reverse Transcriptase
RTC	complexe de retro-transcription
RTIs	inhibiteurs de la RT
RU	unité de résonance
SI	syncytium-inducing
SIDA	Syndrome d'Immuno Déficience Acquise
SIV	virus de l'immunodéficience simien
SNC	Système Nerveux central
SPR	Surface Plasmon Résonance
T-20 :	Enfuvirtide
TAMs	mutations analogues de la thymidine
tat	transactivator
TFE	Trifluoroéthanol
TMgp41	Glycoprotéine transmembranaire
VHB	virus de l'hépatite B
Vif	"viral infectivity"
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIS	Virus de l'Immunodéficience Simien
VLP	Virus-Like Particles
Vpr	"viral protein R
Vpu	"viral protein U

Liste des figures

Figure 1 : Nombre d'adultes et d'enfants vivants avec le VIH – Estimations pour l'année 2011.

Figure 2 : Représentation schématique de la particule virale du VIH-1

Figure 3 : Organisation génomique du VIH

Figure 4 : Cycle de réplication du VIH-1

Figure 5 : Les différentes étapes ciblées par des drogues actuellement utilisées en clinique

Figure 6 : Structure chimiques des principaux inhibiteurs d'intégrase (INIs)

Figure 7: Structure chimique des principaux inhibiteurs de protéase (IPs)

Figure 8 : Figure 9 : Processus de la reverse transcription

Figure 10 : Structure de la Reverse Transcriptase du VIH-1

Figure 11 : Représentation des "hotspots" à l'interface p66/p51

Figure 12 : Les sites catalytiques de la RT

Figure 13 : Localisation des ions Mg^{2+} essentiels dans les sites catalytiques

Figure 14 : Structure chimique des NRTIs utilisés en clinique

Figure 15 : Mécanisme d'action d'un NRTI agissant en tant que terminateur de chaîne.

Figure 16 : Structure chimique des NRTIs en développement 46

Figure 17 : Poche de fixation des NNRTI (NBP) à proximité du site catalytique de la Polymérase

Figure 18 : Structure chimique des NNRTIs actuellement appliqués en clinique

Figure 19 : Zoom sur la poche de fixation des NNRTIs

Figure 20 : Structure chimique des nouveaux NNRTIs

Figure 21 : Les analogues des PPi

Figure 22 : Structure chimique des inhibiteurs à la fois de RNase H et de l'Intégrase RHRTI-IN

Figure 23 : Structure chimique des doubles inhibiteurs de la RNase H et de la polymérase

Figure 24 Mécanisme de dimérisation de la RT

Figure 25 : Structure chimique des inhibiteurs de la DimRTIs

Figure 26 : Représentation schématique des caractéristiques amphipathiques de Pep-1

Figure 27: Mécanisme de transport des peptides inhibiteurs par le peptide vecteur Pep-1

Figure 28 : Illustration schématique de l'appareil BIAcore

Figure 29 : Conception de Pep-7

Figure 30 : Modèle "in silico" du site d'interaction RT/Pep-7.

Figure 31: Mécanisme d'action de Pep-7.

Figure 32 : Fixation de Pep-7 sur RT par la technique SPR

Figure 33 : Impact du peptide PID4 sur le mécanisme de dimérisation de RT

Figure 34 : Etude de la fixation de P27 sur RT par chromatographie d'exclusion de taille sur FPLC

Figure 35: Variations de fluorescence observée pour la fixation de P27 sur RT

Figure 36 : Variations de fluorescence observée pour la fixation de P27 non marqué sur le complexe RT-p/t

Figure 37: Structure des formes ouverte et fermée de la RT

Figure 38 : Modele de "docking" de P27 sur RT

Figure39 : Effet de P27 sur la fixation de la matrice/amorce à RT

Figure40 : Effet de P27 sur la fixation de GTP à RT

Figure 41 : Cinétiques d'incorporation des dNTP à l'état stationnaire en présence de P27

Figure42 : Effet de l'EFV sur l'affinité de RT pour P27

Figure 43 : Effet de P27 et d'EFV sur la fixation de p/t à RT

Figure 44: Effet de P27 sur le double mutant RT^{DM}

Figure 45 : Etude du site de fixation S2 par mutation des résidus K259, L289 I63 et W71

Figure 46 : Cyclisation de P27 par l'établissement d'un pont disulfure entre les deux cystéines en N et C-terminal.

Figure 47: Purification de P27 et Cys-P27 par chromatographie d'exclusion de taille en HPLC

Figure 48 : Analyse de Cys-P27 et P27C par spectroscopie de masse

Figure 49 : Profil de co-injection de Cys-P27 et P27 Cyclique

Figure 50 : Spectre de dichroïsme circulaire du peptide P27 en solution d'eau milliQ

Figure 51 : Versatilité de P27 cyclique par rapport à P27 Linéaire

Figure 52 : Effet de P27 Cyclique (P27C) sur la fixation de p/t-FAM sur les différents mutants résistants

Figures Complémentaires en Annexes : Représentations de Dixon de l'inhibition de l'activité polymérase de la RT par (Figure 1) Pep-7 et P_{ID4}, (Figure 2) Paw et P27, et (Figure 3) P27C

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Fonctions des protéines du VIH est leurs gènes codants

Tableau 2 : Nomenclature des souches de VIH en fonction de leur tropisme viral

Tableau 3 : Définition des différentes variables de l'équation quadratique F

Tableau 4 : Caractéristiques des peptides dérivants de Pep-7

Tableau 5: Activités antipolymérase et antivirale avec l'indice de sélectivité des peptides dérivés de Pep-7

Tableau 6 : Constantes d'Associations des sous unités de RT k_{ass} et activités polymérase k_{ac} de ces RT

Tableau 7 : Activité antivirale de P_{ID4} sur les isolats des différents clades primaires de VIH1

Tableau 8 : Activité antivirale des peptides Pep-7 et P_{ID4} sur les mutants résistants aux différentes molécules actuellement utilisées en clinique.

Tableau 8 : Activité anti-polymérase et antivirale des peptides dérivés de Paw

Tableau 10 : Caractéristiques des différents peptides inhibiteurs

Tableau 11 : Fixation et impact de P27 sur les différents mutants résistants aux NNRTIs

Tableau 12 : Activité antivirale du peptide P27 sur différents mutants résistants aux RTIs en comparaison avec l'AZT

Tableau 13 : Effet de P27C sur le binding de p/t sur RT

Introduction générale

I Historique et épidémiologie de l'infection du virus d'immunodéficience humain VIH

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) appartient à la superfamille des lentivirus, pouvant rester en latence dans l'organisme, et à la famille des rétrovirus, des virus à enveloppe possédant un génome sous forme de 2 copies d'ARN monocaténaire.

Ces rétrovirus possèdent une enzyme, la "Reverse Transcriptase" (RT) qui permet la transcription de l'ARN viral en molécule d'ADN complémentaire bicaténaire, capable de s'intégrer à l'ADN de la cellule hôte (Barre-Sinoussi et al.1983 ; Gallo et al.1983). Le VIH est responsable chez l'homme du Syndrome d'Immuno Déficience Acquise (SIDA), qui correspond à un état affaibli du système immunitaire, le rendant vulnérable à différentes maladies opportunistes et aux cancers. Depuis 2002, le SIDA est classé dans le rang des pandémies, d'autant plus qu'il a provoqué la mort de plus de 25 millions de personnes depuis 1981 à aujourd'hui. La combinaison d'au moins trois molécules pour supprimer la réplication virale et la progression de la maladie, intitulée HAART (*Highly Active Antiretroviral Treatment*) a largement permis d'augmenter l'espérance de vie et le confort des patients. Malgré l'existence de ces traitements antirétroviraux luttant contre le VIH et qui retardent l'apparition du SIDA, réduisant ainsi la mortalité et la morbidité, il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin ou traitement curatif. La prévention, qui passe notamment par les rapports sexuels protégés et la connaissance de son statut sérologique de manière à éviter les infections d'autrui, constitue le moyen de lutte le plus efficace.

I-1 Chronologie des rétrovirus et découverte du VIH

En 1908 le virus de la leucémie aviaire (Ellerman et al. 1908) et en 1911 le virus du sarcome de Rous (Rous et al. 1911) sont les premiers rétrovirus à avoir été observés. Vers la fin des années 50, des rétrovirus provoquant des cancers chez les mammifères, tels que le virus de la leucémie murine de Moloney (MuLV), ont été isolés (Gross et al. 1957). En 1980, le premier rétrovirus humain (HTLV-I pour *Human T-Cell Leukemia Virus I*) a été mis en évidence, puis, en 1983, la découverte du VIH.

En 1981, les informations recueillies par le CDC (*Center of Disease Control*) d'Atlanta sur la situation des maladies infectieuses, signalent un accroissement récent du nombre de cas de

pneumonies à *Pneumocystis carinii* et de sarcomes de Kaposi, infections rares touchant les sujets immunodéprimés. Les premiers cas sont recensés chez des sujets homosexuels.

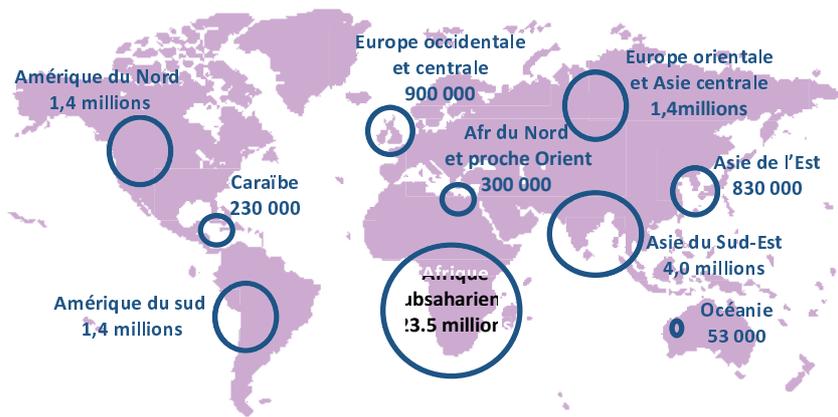
Les mêmes symptômes sont ensuite détectés chez des toxicomanes et des personnes transfusées, puis chez des hommes hétérosexuels et des femmes en Afrique centrale.

Il a été clairement mis en évidence par le CDC en 1982, de l'existence d'un nouveau syndrome caractérisé par l'effondrement dramatique du nombre des lymphocytes T se traduisant par un état immunodéprimé acquis. Les conséquences de cette immunodépression se manifestent par un ensemble de maladies appelé SIDA (Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquisée). Comme dans le cas de l'hépatite B, la transmission par voies sexuelle et sanguine, rend très probable l'origine virale de la maladie. Tout d'abord, le Cytomégalovirus (CMV), le virus de l'hépatite B (VHB) et le HTLV. Mais, ces virus sont en fait responsables d'infections opportunistes, conséquence et non cause de l'immunodéficience.

En 1983, le groupe de Luc Montagnier et Françoise Barré Sinoussi (prix Nobel de Médecine 2008) isole un nouveau rétrovirus humain à partir des lymphocytes du sang prélevé chez un patient atteint du SIDA (Barre-Sinoussi et al. 1983). Après sa découverte, le virus porte divers noms: LAV-1 pour Lymphadenopathy Associated Virus et HTLV-III pour Human T LymphotropicVirus (Gallo et al. 1983). En 1986, le comité international de taxonomie des virus introduit le terme actuel de Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).

I-2 Epidémiologie

Le programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA (ONU/SIDA) montre qu'en fin 2011 environ 34 millions de personnes vivent avec le VIH, 1,7 millions en sont morts, 2,5millions de personnes ont été infectées et que plus de 25 millions en sont décédés depuis la découverte du SIDA (Figure 1). Cependant, un des seuls points positifs est que le nombre des nouveaux cas est en chute libre en 10 ans. Le rapport indique que de 2001 à 2011 le nombre de nouvelles infections avec le VIH a été réduit de plus de 50 % dans 25 pays à revenu faible ou intermédiaire, dont plus de la moitié sont en Afrique subsaharienne, région la plus durement touchée par le virus (23,5millions).



Total : 34.0 millions [31.6 millions – 35.2 millions]

Figure 1 : Nombre d'adultes et d'enfants vivants avec le VIH – Estimations pour l'année 2011. Source : ONU/SIDA et OMS, le point sur l'épidémie de SIDA-Publié en Novembre 2012

La lutte contre le VIH dans certains pays a permis de réduire de façon spectaculaire le nombre de nouvelles infections, par exemple de 73 % au Malawi, 71 % au Botswana, 68 % en Namibie, 58 % en Zambie, 50 % au Zimbabwe et 41 % en Afrique du Sud et au Swaziland.

Outre les bons résultats de la prévention du VIH, l'Afrique subsaharienne a réduit d'un tiers le nombre des décès liés au SIDA sur les six dernières années et augmenté de 59 % le nombre de personnes sous traitement antirétroviral sur les deux dernières années seulement. L'Afrique du Sud a, par exemple, renforcé son élargissement de l'accès au traitement de 75 % sur les deux dernières années et réduit les nouvelles infections à VIH de plus de 50 000 personnes.

Les nouvelles infections à VIH ont reculé de 42% dans les Caraïbes, la deuxième région la plus affectée du monde après l'Afrique subsaharienne.

En Asie, où l'épidémie était en nette progression en 2006, d'énormes efforts ont été réalisés depuis, des pays comme l'Inde et le Cambodge ont connu des réductions de l'infection similaires à celles de certains pays africains, de 25 à 45%, ce qui est dû sans doute au changement des comportements sexuels, à la sensibilisation des populations à risque pour l'utilisation des préservatifs et à la mise à disposition des traitements au plus grand nombre de

malades. La Chine a également réalisé une grande avancée, en 10 ans, la prise en charge de des séropositifs a augmenté de plus 75 %.

En Amérique du Nord, tout comme en Europe occidentale le taux de personnes séropositives reste stable, dû à une meilleure prise en charge des patients et à l'accès aux traitements qui est plus important que dans les autres régions du monde.

Le domaine dans lequel on constate peut-être le plus de progrès concernant la réduction des nouvelles infections à VIH se situe chez les enfants. Les contaminations de mère à l'enfant ayant considérablement diminuées grâce aux traitements mis à la disposition des mères séropositives. Sur les deux dernières années, la moitié de la diminution mondiale des nouvelles infections à VIH a été enregistrée chez les nouveaux nés.

Malgré toutes ces données encourageantes, l'épidémie continue de s'étendre dans d'autres régions du globe. Au Moyen-Orient et en Afrique du nord, le nombre de personnes nouvellement infectées par le VIH a augmenté de 35% entre 2001 et 2011 passant ainsi de 27000 à 37000 personnes. Le taux de nouveaux cas d'infection au VIH augmente largement en Europe de l'Est et en Asie centrale. En Géorgie, Kazakhstan, Kirgizstan, et République de Moldavie, le nombre des nouveaux contaminés par le VIH a augmenté de plus de 25% entre 2001 et 2011. Dans la Fédération de la Russie, le nombre annuel de nouvelles infections a dramatiquement augmenté ces dernières années, ceci reflète en effet une croissance de diagnostique qui était passée de moins de 40 000 en 2006 à plus de 60 000 en 2011.

D'énormes efforts ont été et continuent d'être réalisés au niveau mondial pour faire reculer d'avantage l'épidémie du SIDA, d'autant plus que dans plusieurs pays à faible et moyen revenu, on constate de plus en plus d'investissement national et de moins en moins de dépendance de l'aide internationale. En 10 ans, les ressources mondiales mobilisées pour la lutte contre le SIDA ont quasiment doublé et sont à ce jour à hauteur de 16,8 milliard \$US par an, dont le plus grand donateur reste les Etats-Unis. Il reste pour l'instant une longue route à parcourir pour aboutir à l'objectif zéro infection pour l'année 2015. Selon l'ONU/SIDA, on aura besoin d'à peu près 24 milliard \$ US en 2015 pour réaliser cet objectif. Mais dans le cas de la transmission de la maladie mère à enfant, on pourrait bien arriver à zéro infection, si on maintenait la même cadence.

II Le virus de l'immunodéficience humaine

II-1 Classification des rétrovirus

Le VIH appartient à la famille des rétrovirus. Ils sont définis principalement par leur mode de réplication et sur la base de critères de pathogénicité, on distingue trois sous-familles.

II-1.1 Les Spumavirus

Ce sont des virus "non pathogènes". Ces virus ont été découverts par hasard au début des années 1950 chez plusieurs espèces animales (singes, bovins, chats, hamsters) où ils provoquent des infections silencieuses. Ils ont également été isolés chez l'Homme (en 1970). Les cellules infectées in vitro présentent des lésions qui ressemblent à de l'écume ("*spuma*" signifie mousse).

II-1.2 Les Oncovirus

Les *Oncovirinae* représentent la sous-famille majoritaire. Ce type de virus a été observé chez les insectes, les sangsues, les reptiles, les oiseaux et les mammifères. Les oncovirus peuvent induire les tumeurs les plus variées : ils sont associés au développement de sarcomes (tumeurs du tissu conjonctif), de carcinomes (tumeurs des tissus épithéliaux), de lymphomes et de leucémies. Ce dernier type de tumeurs est le plus fréquent dans la pathologie rétrovirale. Le virus HTLV-1, entre autres, appartient à cette sous-famille

II-1.3 Les Lentivirus

Les lentivirus sont des virus cytopathogènes. Ils ont d'abord été isolés chez l'animal comme responsables de maladies à évolution lente ("*lentus*" signifie lent), c'est à cette sous-famille qu'appartient le VIH. Les lentivirus infectent principalement les cellules du système immunitaire (macrophages et lymphocytes T CD4+). Par conséquent, les infections lentivirales résistent au système immunitaire et induisent généralement des immunodéficiences sur des périodes relativement longues. Un autre caractère distinctif des virus de cette sous-famille, particulièrement pour le VIH, consiste en leur capacité à infecter

des cellules quiescentes et/ou en différenciation terminale. Leur génome contient l'information pour tous les gènes essentiels et accessoires nécessaires à l'expression des protéines virales dans les cellules infectées. Les lentivirus ont aussi la capacité de réduire l'expression de leurs protéines chez les cellules infectées et d'établir un état de latence. Ce dernier peut persister sur une longue période jusqu'à la réactivation du virus lors d'une réponse cellulaire. L'existence de cellules réservoirs notamment les lymphocytes, les cellules du système nerveux central (infectées de façon latente) est un des principaux obstacles à l'éradication du VIH chez les patients sous thérapie antirétrovirale.

II-2 Variabilité du VIH

II-2.1 Classification de différents types de VIH

Deux types de VIH ont été isolés et identifiés : Le VIH-1, est à l'origine du SIDA alors que le VIH-2, est responsable d'un syndrome d'immunodéficience se développant lentement (Blattner et al. 1993 ; Weiss et al. 1988). Les deux types de ce virus se différencient par leur origine géographique, par l'organisation de leur génome, mais aussi par la relation phylogénétique qu'ils ont avec les autres lentivirus de primates dont ils sont tous les deux issus.

Le VIH-1 se caractérise par une grande variabilité génétique. Les souches de virus peuvent être classées selon trois groupes :

- Le groupe M (*Main*), majoritaire, regroupe onze sous-types de VIH-1 (A à K) classés en fonction de leurs séquences virales (Mc Cutchan et al. 1999), le B étant le plus répandu en France et le C prédominant au niveau mondial.
- Le groupe O (*Oublier*), très rare, retrouvé au Gabon et au Cameroun.
- Le groupe N (Non-M et Non-O), également rare, identifié au Cameroun.

Antigéniquement distinct du VIH-1, et également moins pathogène, le VIH-2 a une diffusion restreinte à l'Afrique de l'Ouest. Mais actuellement, avec les mouvements de populations, on l'a retrouvé en Europe et en Asie particulièrement au Portugal et en Inde.

L'apparition des souches de VIH découle probablement d'une transmission inter espèce entre des hommes et des primates infectés par le Virus de l'Immunodéficience Simien (VIS). Plusieurs modes de transmission ont été proposés, dont une exposition directe des hommes à du sang animal contaminé lors de chasse de primates ou de consommation de viande

contaminée crue. L'hypothèse d'une transmission à l'Homme au cours d'une campagne massive de vaccination contre la poliomyélite, dans les années 1950, au Congo Belge, au Rwanda et au Burundi a également été avancée (Hooper et al. 1998). Certaines équipes de recherche ont, depuis, estimé l'apparition des premières souches du VIH (groupe M) au début des années 1930, réfutant ainsi la thèse de la transmission par les vaccins (Korber et al. 2000).

II-2.2 Mécanismes engendrant la variabilité du virus

Tous les gènes du VIH-1 sont variables, les gènes *gag* et *pol* étant les plus conservés, alors que le gène *env* est, quant à lui, hypervariable. Cette variabilité génétique, qui se traduit par une diversité antigénique élevée du virus, est liée à plusieurs mécanismes :

- l'absence d'activité correctrice de la transcriptase inverse, induisant la génération d'erreurs à un taux d'environ $3,5 \cdot 10^{-5}$ erreurs par base et par cycle répliatif (Mansky et al. 1995). Ainsi, toute erreur d'incorporation de nucléotides dans la synthèse du brin d'ADN est fixée de manière définitive (Sala et al. 1995).

- la recombinaison entre les génomes de deux virus distincts (Hu et al. 1990a ; 1990b). Les cellules pouvant être infectées par plusieurs virus, les génomes ARN des différents virus peuvent s'associer dans la même particule au moment du bourgeonnement (Jung et al. 2002). Après infection d'une nouvelle cellule, ils peuvent alors se recombiner au moment de la transcription inverse. Cette propriété explique la possibilité d'apparition de résistances à certains traitements qui seraient moins fréquentes dans le cadre de poly thérapies.

La variabilité contribue à la génération de variant viraux intra-individuels, mais également inter-individuels, plus éloignés génétiquement. Ainsi, les souches du VIH-1, isolées à travers le monde, sont continuellement caractérisées en fonction de leur homologie de séquence et peuvent être différenciées en 3 groupes M, O et N.

II-3 Caractéristiques du virus

II-3.1 Organisation de la particule virale

Le VIH (Figure 2) possède une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique, dérivée de la membrane plasmique de la cellule hôte infectée. La surface de cette enveloppe est recouverte de complexes protéiques responsables de l'attachement du virus sur les cellules hôtes. Il s'agit de spicules formées par l'association non covalente de deux glycoprotéines, gp120 et gp41, présentes sous forme de trimères (Zhu et al. 2003). La protéine gp120 se fixe aux récepteurs cellulaires tandis que gp41 est responsable de la fusion des membranes virale et cellulaire. Ces deux protéines sont codées par le gène *env*, sous la forme de gp160, une protéine précurseur qui sera glycosylée puis clivée en gp41 et gp120. La face interne de l'enveloppe est tapissée d'une couche de 7 nm de p17, une protéine codée par le gène *gag* et constituant la matrice. Le cœur du virion renferme deux copies d'ARN viral, protégées par une capsidie formée par l'assemblage des protéines p24, autre produit du gène *gag*. Associées aux molécules d'ARN, on trouve de nombreuses protéines virales impliquées dans le processus d'encapsidation du matériel génétique au cours du cycle viral (p7, par exemple) ou nécessaires à l'infection virale d'une cellule hôte (la transcriptase inverse, l'intégrase, la protéase). Le gène *pol* (polymérase) code pour les différentes enzymes virales indispensables: la protéase (PR), la reverse transcriptase (RT) et l'intégrase (IN). Dans un premier temps, le gène *pol* est synthétisé en une seule polyprotéine P160^{gag-pol} et ensuite lors de la maturation, elle est clivée par la protéase virale PRp15 en Gag et Pol.

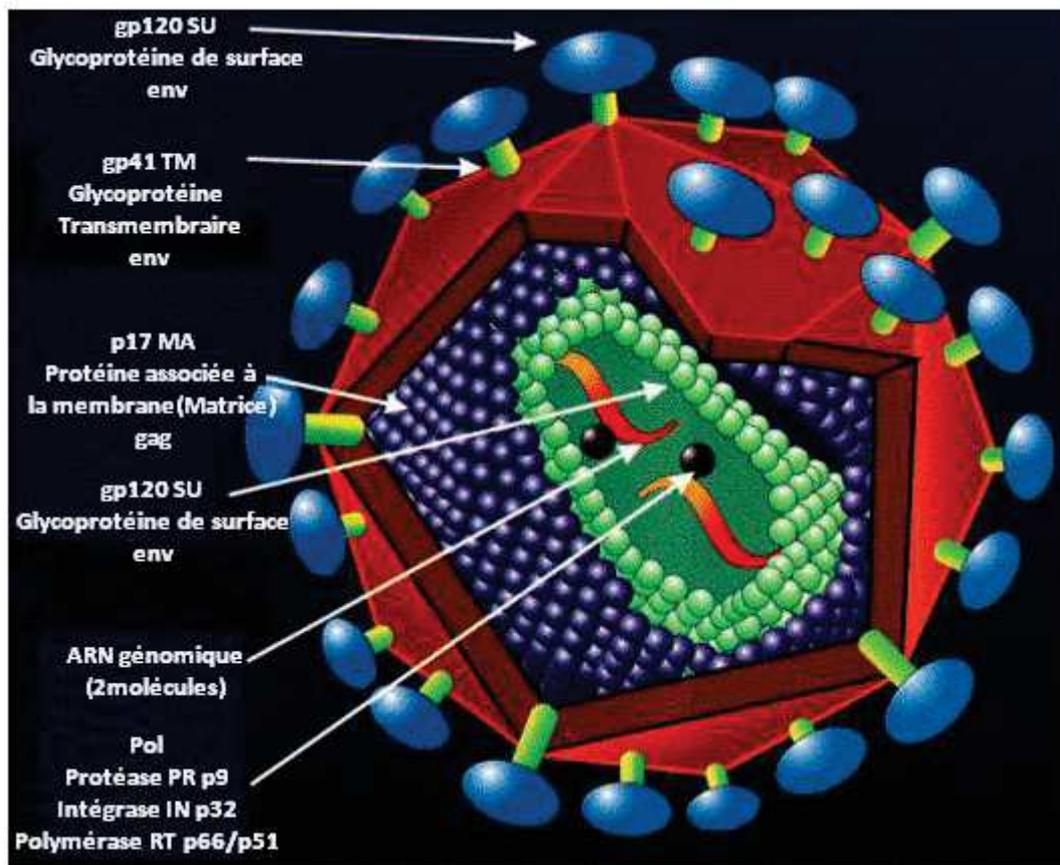


Figure 2 : Représentation schématique de la particule virale du VIH-1

Le génome viral, constitué de deux molécules d'ARN est associé aux protéines de nucléocapside et accompagné des enzymes virales (protéase, intégrase, reverse transcriptase). Ce complexe nucléoprotéique est contenu dans la capside elle-même entourée de la matrice qui tapisse l'intérieur de la particule virale. Tout à l'extérieur, la membrane du virus constituée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire, dans laquelle sont insérées des glycoprotéines gp 41 et gp 120 formants des spicules.

Adapté de: Martin S. Spiller, D.M.D (http://www.doctorspiller.com/AIDS/HIV-The_Virus.htm)

II-3.2 Organisation du génome

Le génome, d'une taille de 9200 pb, code pour les protéines virales et est encadré par deux régions non codantes (Figure 3). De 5' en 3', on trouve :

- la région non codante 5' (5' LTR pour Long Terminal Repeat),
- le gène *gag* (pour *group specific antigens*), qui code pour une polyprotéine ultérieurement clivée en protéines (de capside, de nucléocapside et de matrice) par la protéase virale,

- le gène *pol* (pour *polymérase*), qui code pour les trois enzymes : la Reverse transcriptase (RT), l'Intégrase (IN) et la Protéase (PR),
- le gène *env* (pour *enveloppe*), qui code pour gp160. De part et d'autre du gène *env*, on trouve des gènes de régulation (*tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*).
- La région non codante 3'LTR.

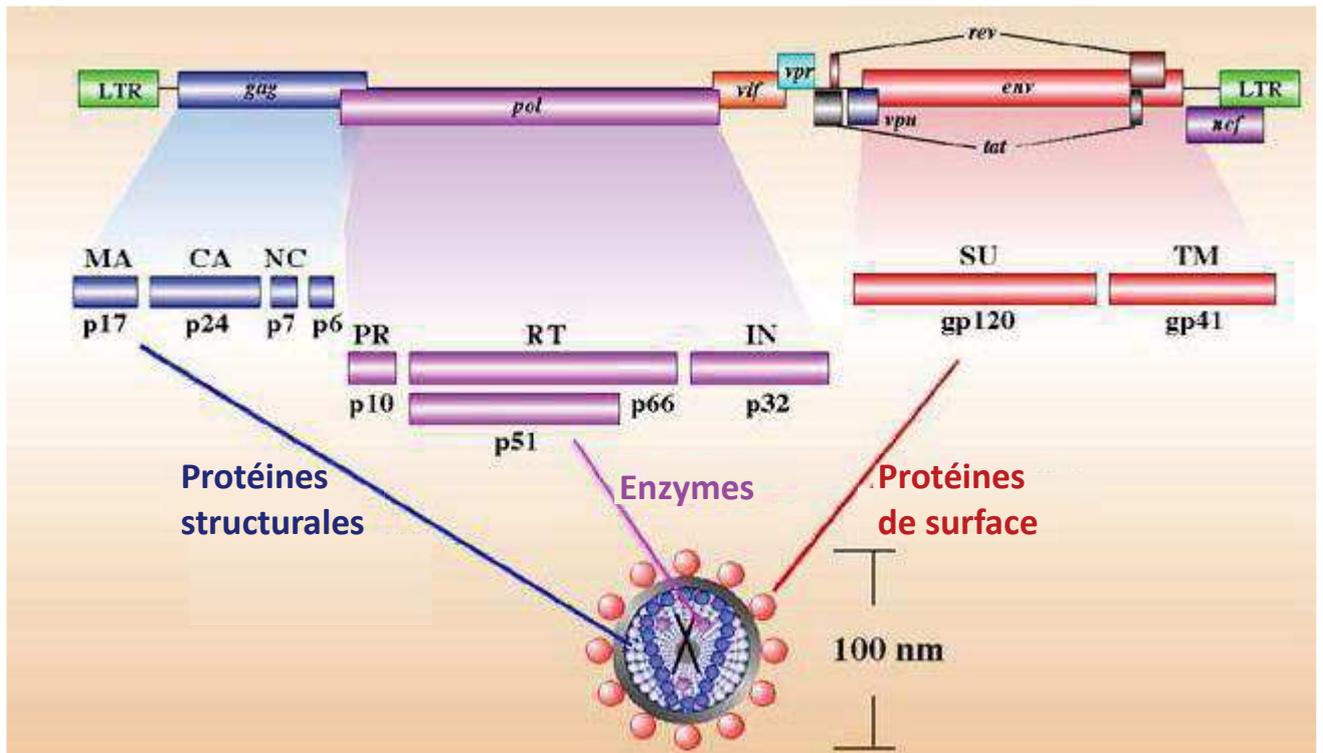


Figure 3 : Organisation génomique du VIH

Le génome du VIH est constitué de 3 gènes principaux, *gag*, *pol* et *env*, qui codent respectivement pour des protéines de la capsid, des enzymes virales et des protéines d'enveloppe. Il existe également plusieurs gènes codant pour des protéines régulatrices. L'ensemble de ces gènes est encadré par deux régions LTR non codantes.

Source : Stanford University (Mandell, Gerald L. et al. Principles and Practice of Infectious Disease. Sixth Edition Churchill Livingstone. October 22, 2004. pp. 2122)

Les régions non codantes pour les enzymes et les protéines structurales sont les régions stratégiques pour le virus. Elles comportent des signaux de régulation de la transcription et de la traduction, des séquences d'amorçage de la réplication, des signaux pour l'intégration et pour l'encapsidation. Outre les gènes *gag*, *pol* et *env*, le VIH possède six gènes codant pour de petites protéines régulatrices (Figure 3 et Tableau I). On peut notamment mentionner Tat et Rev, qui assurent des fonctions régulatrices indispensables à la réplication du virus. Les quatre autres protéines Nef, Vif, Vpr (VIH-1) et Vpu (VIH-2) ne sont pas directement

impliquées dans la réplication virale dans les lymphocytes T, mais confèrent au virus son degré de virulence.

Gènes	Protéines	Fonctions
<i>env</i>	SUgp120	Glycoprotéine de surface : fixation de CD4+
	TMgp41	Glycoprotéine transmembranaire : Fusion membranaire
<i>gag</i>	MAp17	Matrice : assemblage du virus et fixation à la membrane
	CAp24	Capside : assemblage du virus
	Ncp7	Stabilisation de l'ARN viral et assemblage du virus
	P6	Assemblages et maturation des virions
<i>pol</i>	PRp15	Maturation du virus
	RT	Transcription d'ARN viral simple brin en ADN pro-viral double brins
	IN	Intégration de l'ADN pro-viral dans le génome de la cellule hôte
<i>tat</i> (<i>transactivator</i>)	p14	Régulation positive de la transcription
<i>rev</i> (regulator of viral expression)	p19	Export des transcrits non épissés hors du noyau
<i>vif</i> (viral infectivity)	p23	Inhibition de la désamination de l'ADN viral en liant la protéine antirétrovirale APOBEC3G
<i>vpr</i> (viral protein R)	p15	Transport de l'ADN au noyau, augmentation de la production virale, contrôle du cycle cellulaire
<i>vpu</i> (viral protein U)	p16	Réduction de l'expression de CD4
<i>nef</i> (negative regulation factor)	p27	Augmentation de l'infectivité, réduction de l'expression de CD4

Tableau 1 : Fonctions des protéines du VIH est leurs gènes codants

II-3.3 Le cycle viral

Le cycle de réplication du VIH (Figure 4) est similaire à celui des autres rétrovirus et débute par l'attachement du virus sur la cellule cible.

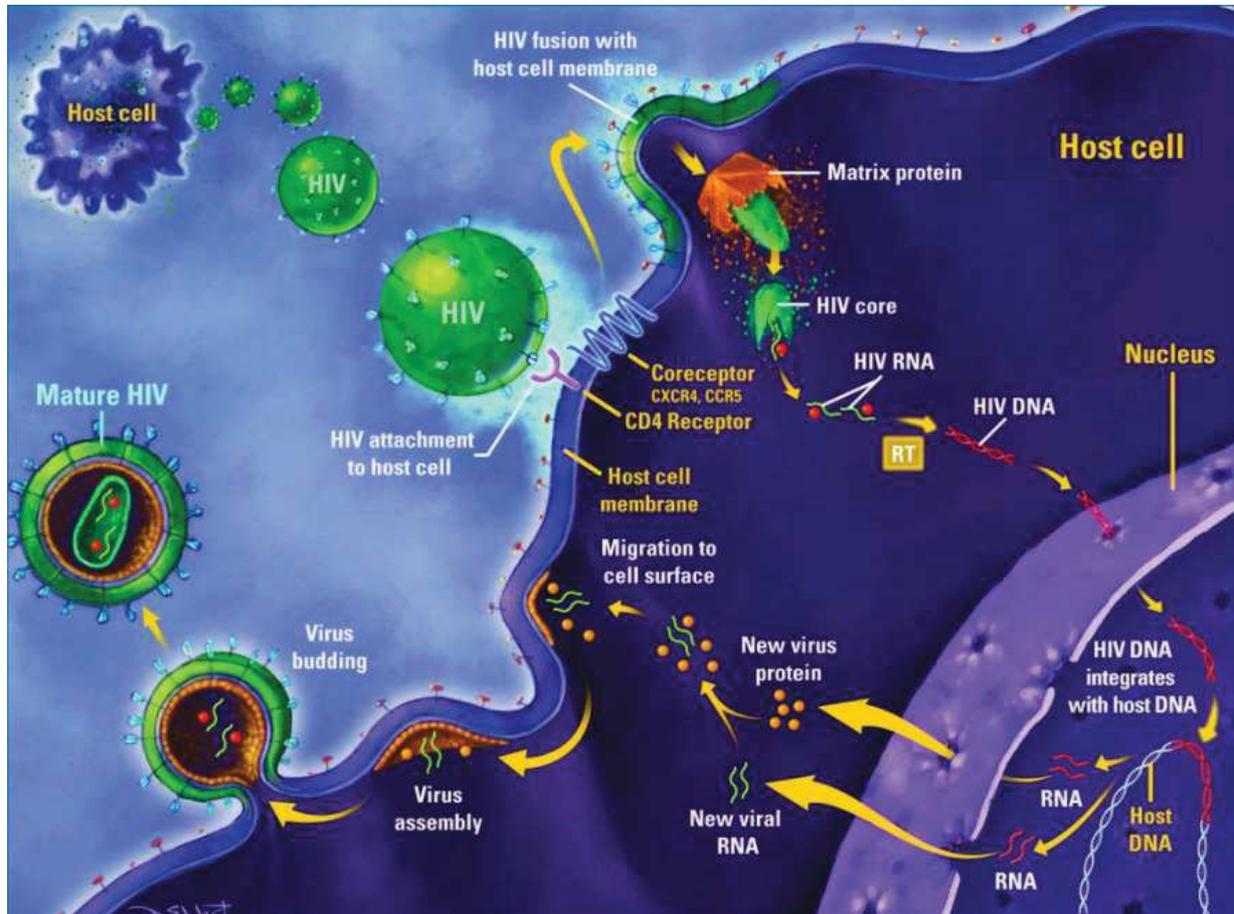


Figure 4 : Cycle de réplication du VIH-1 (Pomerantz et al. 2003)

Le virus s'attache à la cellule via des interactions entre gp120 et les récepteurs cellulaires CD4 et CXCR4 ou CCR5. La fusion des membranes virales et cellulaires est initiée par une réorganisation de gp41 ; l'ARN viral associé à la RT et formant le Complexe de Retro-Transcription (RTC) est alors introduit dans la cellule où l'ARN est rétro-transcrit par la Reverse Transcriptase. L'ADN ainsi synthétisé associé à l'intégrase, formant ainsi le complexe de pré-intégration (PIC), est transporté vers le noyau et intégré dans l'ADN cellulaire, où il est transcrit et traduit, au même titre que le génome de la cellule. Les nouveaux virions sont assemblés au niveau de la membrane cellulaire d'où ils bourgeonnent.

II-3.3.1 Phase précoce du cycle viral

Dans un premier temps, la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120 s'associe avec le récepteur CD4 à la surface des cellules. Cette interaction provoque un changement conformationnel de gp120 qui aboutit à la formation et/ou l'exposition d'un épitope particulier, CD4i (CD4 induit). Ce site est reconnu par les chimiorécepteurs CCR5 ou CXCR4 qui jouent le rôle de corécepteurs de gp120 à la surface cellulaire (Doranz et al. 1996 ; Feng et al. 1996 ; Clapham et al. 1997 ; Moore et al. 1997). Cette deuxième interaction entraîne la modification de la structure de gp41 et permet au peptide hydrophobe "fusogénique" se situant à son extrémité N-terminale de se déployer et de pénétrer dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire. Un dernier changement de conformation de gp41 permet le rapprochement et la fusion des deux membranes, conduisant au transfert de la capsid virale dans la cellule cible.

- Le complexe de retro-transcription (RTC)

Une fois dans la cellule hôte, la capsid se désagrège progressivement pour laisser place aux complexes de Retro-Transcription (RTC) formé par l'ARN viral associé à la RT, à l'ARNt₃^{Lys}, et à quelques protéines virales telles que l'IN, la Vpr, la NC.

La transcriptase inverse crée alors une copie d'ADN à partir de la matrice d'ARN, puis hydrolyse le brin d'ARN (Goff et al.1990 ; Katz et al.1994). La Reverse transcriptase suit un mécanisme très complexe qui conduit à la création de séquences particulières au niveau des LTR. En 5', le LTR est un promoteur puissant de la transcription. En 3', il fournit le signal de coupure qui précède la polyadénylation; c'est aussi un promoteur potentiellement capable d'activer un gène cellulaire situé à proximité. A ce stade, l'ADN pro-viral n'exprime aucune protéine virale. Contrairement à certains autres virus, le VIH peut également infecter des cellules qui ne sont pas en division, tels que des lymphocytes T non activés pour constituer des réservoirs. Ce qui rend son élimination plus difficile en comparaison avec d'autres virus.

- Le complexe de pré-intégration (PIC)

L'ADN pro-viral forme un complexe de pré-intégration (PIC : l'intégrase virale fixée au niveau des LTR de l'ADN) et est transporté dans le noyau, où il se circularise (Depienne et al.2001).

L'intégrase coupe alors les deux brins de l'ADN de la cellule hôte pour introduire l'ADN viral dans celui de la cellule hôte. L'intégration semble pouvoir se faire dans de multiples sites de l'ADN cellulaire.

II-3.3.2 Phase tardive de maturation des virions

Un seul et unique polypeptide est ainsi synthétisé, qui sera clivé par la protéase virale (PR) en protéines ayant chacune une fonction particulière. La transcription du provirus intégré dans le génome cellulaire dépend du niveau d'activation de la cellule hôte. Dans les cellules quiescentes, il n'y a pas de transcription du génome viral. L'ADN est alors transmis aux cellules descendantes à chaque mitose, les gènes du VIH étant temporairement silencieux, lui conférant ainsi une invisibilité antigénique : c'est la latence. A l'opposé, toute stimulation conduisant à l'activation de la cellule va induire la transcription du génome viral par l'ARN polymérase II de la cellule hôte. Lors de l'activation de la cellule, les facteurs de transcription cellulaires nécessaires (NF- κ B) vont être disponibles et pourront être recrutés au niveau du promoteur viral. La machinerie de la cellule hôte et celle du virus sont toutes les deux nécessaires pour la transcription des gènes viraux. La transcription commence au niveau de la région R du LTR en 5' et se termine après la région R du LTR en 3' par un signal de polyadénylation.

Les transcrits viraux ont donc la même structure que tout ARN messager eucaryote (ARNm), avec une coiffe à l'extrémité 5' et une queue de polyadénines (poly A) à l'extrémité 3'. De ce fait, ils sont épissés par les enzymes cellulaires. Après la transcription, les ARNm viraux sont traduits, permettant la production des protéines de l'enveloppe, des éléments structurels du virion et des enzymes virales (transcriptase inverse, protéase et intégrase).

Les protéines virales s'assemblent ensuite au niveau de la membrane cellulaire pour former une particule virale immature qui bourgeonne à partir de la cellule infectée. Le gène *gag* (Free et al. 1998) porte les informations nécessaires à l'assemblage et au bourgeonnement des virions. Il code pour une poly-protéine de 55 kDa (le précurseur Gag) qui, au cours de la maturation du virus, est clivée en quatre protéines par la protéase : p17 (matrice), p24 (capside), p7 (nucléocapside) et p6. Le seul élément nécessaire au bourgeonnement semble être la protéine p6. En effet, des cellules exprimant uniquement cette protéine sont capables de produire des vésicules (appelées particules pseudo-virales ou VLP pour *Virus-Like Particles*) de la taille des particules virales immatures (Gheysen et al.1989; Shioda et al.1990). La protéine p6 co-localise avec l'actine, sur la face interne de la membrane cellulaire (Rey et al.1996). Pour initier le bourgeonnement, p6 recrute diverses protéines cellulaires, dont Tsg101 (Garrus et al.2001) et cdc42 (Audoly et al.2005) qui jouent un rôle dans la polymérisation de l'actine. Le virus emporte également avec lui une panoplie de composants cellulaires tels que des protéines du cytosquelette (Ott et al.2000; Chatel-Chaix et al.2004) (actine, ezrine, moesine, cofiline), de la cyclophiline A (Thali et al.1994), des complexes

ESCRT-1 et de l'APOBEC3G (Douaisi et al.2004). Cependant, la cytidine deaminase APOBEC3G (Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic polypeptide-like) est un facteur cellulaire naturel de défense contre les rétro-transposons et les rétrovirus, une fois encapsidé dans les virions, il induit des mutations létales (de G en A) lors de la prochaine synthèse d'ADN virale (Izumi T et al. 2008 ; Zhang H et al. 2003). Néanmoins, le virus utilise la protéine Vif pour bloquer l'activité de l'APOBEC3G et empêcher aussi son encapsidation dans les futures virions lors d'assemblage et de bourgeonnement (Henriet et al. 2009 ; Blanco-Melo et al. 2012). D'autres protéines sont incorporées dans l'enveloppe virale : les molécules du CMH-I et II représentent près de 20% des protéines retrouvées sur l'enveloppe du VIH-1 (Henderson et al.1987). Certaines souches présentent également la molécule ICAM-1 (Bounou et al. 2002).

II-4 le tropisme viral

La capacité du VIH à infecter différentes populations de cellules est connue sous le nom de «tropisme viral». Les récepteurs CCR5 et CXCR4 jouent un rôle majeur dans la détermination de ce tropisme et, par conséquent, du type cellulaire infecté.

Quelques années après la découverte du VIH, la tendance de certaines souches à induire la formation de syncytia a été observée (Tersmette et al. 1988) et a permis de classifier les souches virales comme étant *syncytium-inducing* (SI) ou *non-syncytium-inducing* (NSI). Les souches NSI, infectant prioritairement des macrophages et observées lors de la phase précoce et asymptomatique de la maladie, ont été nommées « M-tropiques ». Pour leur part, les isolats viraux SI, plus pathogènes, infectant principalement des lymphocytes T et observés lors de la manifestation symptomatique du SIDA, ont été désignés "T-tropiques" (Berger et al.,1998; Richman et al. 1994).

La découverte des corécepteurs CCR5 et CXCR4 a, par la suite, fourni les bases à l'élaboration d'une nomenclature précisant le tropisme viral. Les souches M-tropiques (ou NSI) utilisent principalement le récepteur CCR5 comme vecteur d'infection et ont, de ce fait, été nommées R5.

Les souches virales T-tropiques (ou SI), utilisant préférentiellement CXCR4, ont, quant à elles, été appelées X4. Il existe également une troisième population virale, capable de se fixer indifféremment sur CCR5 ou CXCR4, qui a été désignée R5X4 ou *dual-tropic* (Simmons et

al.1996). Comme les isolats viraux X4, les virus R5X4 ont été observés en corrélation avec la diminution drastique de la population lymphocytaire T et l'apparition d'infections opportunistes liées au SIDA (tableau II).

Souches	Cellules cibles	Corécepteur utilisé	Pathogénicité
NSI, M-tropique, R5	Macrophage, monocyte	CCR5	+
SI, T-tropique, X4	Lymphocyte	T CXCR4	+++
Dual-tropique, R5X4	Macrophage, monocyte, lymphocyte T	CCR5 ou CXCR4	+++

Tableau 2 : Nomenclature des souches de VIH en fonction de leur tropisme viral.

II-5 Pathologie du VIH

II-5.1 Passage du virus à travers les muqueuses

Dans le cas d'une contamination par voie sexuelle, le VIH, libre ou présent dans des cellules mononuclées (lymphocytes, macrophages), doit traverser les muqueuses épithéliales pour atteindre des sites de réplication dans les tissus lymphoïdes. Au niveau de ces muqueuses, les cellules dendritiques (DC) sont les principales cibles du VIH. Ces cellules sont classées en fonction des lectines calcium-dépendantes qu'elles expriment : DC-SIGN (*Dendritic Cell Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin* appelé aussi CD209) pour les cellules dendritiques (DC) et la langérine pour les cellules de Langerhans (LC). Les LC sont situées dans l'épiderme de la peau et de la plupart des muqueuses épithéliales alors que les DC sont localisées dans le sub-épithélium (Patterson et al.2002).

DC-SIGN est capable de fixer le VIH (souches X4 ou R5), au niveau de gp120 avec une affinité supérieure à celle de l'interaction gp120/CD4 (Curtis et al.1992), et de l'endocytoser dans un compartiment endosomal où le virus reste intégralement à la différence de la voie classique de fusion du virus avec la membrane cellulaire (Kwon et al. 2002). Le virus résiste à l'environnement acide de l'endosome et est alors protégé ; il peut rester infectieux pendant 25 jours *in vitro* (Smith et al.2001). Par ailleurs, les DC expriment également les récepteurs

nécessaires à l'infection classique par le VIH (CD4 et CCR5), et peuvent donc être infectées. L'événement biologique, endocytose du virus ou réelle infection, qui prédomine lors d'une exposition au VIH n'est pas connu. L'hypothèse est qu'il existe deux phases d'infection. Lors de la première phase qui survient rapidement après une exposition au VIH, les DC transfèrent le virus aux Lymphocytes T sans être infectées de façon productive. Dans la seconde phase, une fois que les DC sont réellement infectées, ce sont des virus nouvellement synthétisés qui sont transférés aux lymphocytes T (Magerus-Chatinet et al.2007). La première étape fait intervenir DC-SIGN qui transfère aussi bien les virus X4 que R5. En revanche, la deuxième phase implique les récepteurs CD4 et CCR5 et, de ce fait, pourrait permettre de sélectionner uniquement les souches R5, expliquant ainsi leur prédominance dans les étapes précoces de l'infection.

II-5.2 Infection des cellules du système immunitaire

Les cellules dendritiques, stimulées par le VIH, subissent un processus de maturation et deviennent des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette maturation est associée à une migration vers les organes lymphoïdes secondaires pour initier la réponse immunitaire. Cette migration est très rapide puisque 2 à 3 jours après l'inoculation du virus, on ne détecte plus de DC infectées dans les muqueuses épithéliales (Zhang et al. 1999). Dans les organes lymphoïdes, les DC transmettent le virus aux lymphocytes T par des mécanismes d'infection classique, d'infection en *trans* (si la DC a seulement capturé le virus) ou par la mise en place de synapses virologiques. Les macrophages sont également une cible privilégiée du VIH.

Les lymphocytes et les macrophages sont des cellules disséminées dans la plupart des organes, permettant à l'organisme sain de reconnaître les antigènes étrangers et de déclencher une réponse immunitaire physiologique. Elles expriment le récepteur CD4 et les corécepteurs nécessaires à l'infection par le VIH. Le niveau d'expression de CCR5 et CXCR4 varie en fonction de l'état de maturation des cellules : globalement, les macrophages expriment CCR5 alors que les lymphocytes T expriment les deux types de corécepteurs (CXCR4 prédomine sur les lymphocytes naïfs et CCR5 sur les lymphocytes activés et les lymphocytes mémoires) (Bleul et al. 1997; Granelli-Piperno et al.2005). D'autres cellules du système immunitaire peuvent, à moindre échelle, être la cible du VIH : les lymphocytes B (Hioe et al. 2001), les

neutrophiles (Paquette et al.1998), les mastocytes (Ali, A et al. 2003), les lymphocytes T CD8+, les cellules NK et NKT (*Natural Killer* et *Natural Killer T cells*) (Stuchell et al. 2004).

II-5.3 Les réservoirs viraux

Plusieurs études ont montré que certains types cellulaires, *via* leurs récepteurs d'attachement, sont capables de protéger le virus pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines.

Par exemple, les cellules dendritiques et les macrophages peuvent capturer et internaliser le virus dans des endosomes où le virus, apparemment résistant aux conditions acides, peut persister de plusieurs jours pour les cellules dendritiques (Smith et al. 2001) à plusieurs semaines pour les macrophages (Pelchen-Matthews et al.2003 ; Sharova et al.2005). De même, les cellules endothéliales, riches en héparane sulfate (HS) mais non permissives pour la réplication du VIH, sont capables de fixer le virus à leur surface via ces HSPG (Bobardt et al. 2003). Cette fixation permet d'augmenter la résistance des virus (de 1 jour pour un virus libre à 6 jours pour un virus fixé aux HS). Les cellules endothéliales présentent ensuite le virus aux lymphocytes T, permissifs mais exprimant peu d'HS. Deux hypothèses permettent d'expliquer ce phénomène. La première consiste à penser que les HSPG pourraient permettre l'internalisation du virus dans les cellules endothéliales, de la même manière que DC-SIGN à la surface des cellules dendritiques. L'autre hypothèse est que les longues chaînes anioniques des HS pourraient directement protéger le virus de la dégradation, sans l'internaliser (Bobardt et al. 2003).

Certaines cellules sont, par ailleurs, capables de protéger le virus pendant Longtemps (lymphocytes T non activés) (Han Y et al. 2007 ; Thibault S et al., 2009). Lorsque la trithérapie est apparue au milieu des années 1990, il a été initialement conclu qu'un traitement prolongé pourrait permettre d'éliminer le virus. Depuis, il a été prouvé que, dans certaines conditions, le virus peut persister des années en présence d'antirétroviraux. On parle, dans ce cas, de réservoirs viraux. Les lymphocytes T mémoires constituent majoritairement ces réservoirs. Les lymphocytes T activés sont très sensibles à l'infection par le VIH et sont généralement détruits rapidement, soit par les effets du virus, soit par la réponse immunitaire. Cependant, certaines cellules peuvent être infectées et retourner à l'état de repos, sous la forme de lymphocytes mémoires (Chun et al. 1995 ; Han Y et al. 2007 ; Thibault S et al., 2009). Ils peuvent alors être activés lors d'une interruption de la trithérapie. Cette latence est due à plusieurs facteurs :

Faible stock de nucléotides, facteurs de transcription (NF- κ B) exclus du noyau à l'état de repos, incapacité d'importer l'ADN viral dans le noyau (Bukrinsky et al. 1992; Zack et al.1992). Ces réservoirs sont extrêmement stables et des études ont estimé la demi-vie de ces cellules à 44 mois. Dans ces conditions, il faudrait plus de 73 années de thérapie pour éradiquer les virus de ces réservoirs. Enfin, dans le système nerveux central, les cellules microgliales (Ryzhova et al.2002) et les astrocytes (Liu et al. 2004) peuvent conserver le virus dans un état latent.

III Les différents stades de la maladie du SIDA

La maladie évolue en trois phases successives. La phase de primo-infection peut être symptomatique ou asymptomatique (cliniquement silencieuse). Lorsqu'elle est symptomatique (chez 50% des sujets infectés), elle se manifeste par des signes généraux peu spécifiques : adénopathies cervicales, fièvre, pharyngite avec dysphagie, fatigue, myalgies, courbatures, éruption maculopapuleuse. Comme ces symptômes ressemblent à ceux observés au cours de diverses infections virales aiguës (comme la mononucléose infectieuse), la primo-infection risque souvent de passer inaperçue. Les premiers signes d'infection apparaissent en moyenne 20 jours après la contamination et durent de 1 à 3 semaines. Cette phase correspond à une multiplication virale intense et à la dissémination du virus. L'évolution vers le SIDA est plus rapide après une primo-infection symptomatique (on constate en effet une charge virale très élevée). Le système immunitaire réagit à l'infection et, en quelques semaines, des anticorps apparaissent dans le sérum, dirigés contre l'ensemble des protéines du VIH, c'est la séroconversion : le sujet infecté devient séropositif. La deuxième phase est asymptomatique et peut être très prolongée (10 à 15 ans). Le virus se réplique continuellement dans les organes lymphoïdes : les lymphocytes T vont lentement, mais inexorablement, diminuer. Enfin, la phase clinique correspond au SIDA proprement dit : lorsque le nombre de lymphocytes T devient inférieur à $200/\text{mm}^3$, le syndrome d'immunodéficience apparaît. Les manifestations les plus fréquentes sont des infections opportunistes.

III-1 Le stade SIDA et les maladies opportunistes

Les maladies infectieuses et cancéreuses profitent d'un système immunitaire qui n'est plus capable de protéger l'organisme. L'apparition de n'importe laquelle des vingt-cinq infections opportunistes confirme le diagnostic clinique du SIDA chez les individus séropositifs.

L'infection opportuniste la plus fréquente est la pneumonie par *Pneumocystis carinii* provoquée par un champignon qui existe dans les voies aériennes de tous les individus. On remarque aussi des pneumonies bactériennes (dues à plusieurs types de bactéries dont *Streptococcus* et *Haemophilus*) et la tuberculose (infection respiratoire bactérienne causée par *Mycobacterium tuberculosis*).

Au cours de la phase tardive du SIDA, la dissémination de l'infection par *Mycobacterium avium* peut provoquer fièvre, perte de poids, anémie et diarrhée. Des symptômes associés à certaines infections bactériennes du tube digestif (dues à *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella* ou d'autres bactéries) peuvent aussi apparaître. D'autres infections fongiques, ou mycoses, sont fréquemment observées chez les patients. La candidose orale ou muguet (infection de la bouche par le champignon *Candida*) survient au début de la phase symptomatique chez un grand nombre de patients. Des infections par des espèces de *Cryptococcus* se produisent parfois, provoquant des méningites chez un patient sur dix. Des histoplasmoses dues à *Histoplasma capsulatum* affectent jusqu'à 10 % des patients et causent une perte de poids, de la fièvre et des complications respiratoires, ainsi que de graves complications au niveau du SNC, y compris des formes de démence.

Les infections opportunistes virales, spécialement par des membres de la famille des virus de l'herpès, sont fréquentes. L'un des membres de cette famille, le cytomégalovirus (CMV), infecte la rétine et peut causer la cécité. Un autre virus de la même famille, le virus *Epstein-Barr*, peut entraîner la transformation cancéreuse des cellules sanguines. Les infections par les virus herpétiques de type 1 et 2 provoquent des lésions orales et périanales évolutives.

De nombreux malades du SIDA développent des cancers, dont l'un des plus communs est le sarcome de Kaposi et le lymphome malin (ou hématosarcome) à cellules B. Le sarcome de Kaposi est un cancer des vaisseaux sanguins d'origine virale qui provoque des lésions cutanées pourpres pouvant s'étendre aux organes internes et provoquer la mort.

Le VIH pénètre le SNC très rapidement après l'infection périphérique et peut induire des problèmes neurologiques sévères, incluant un comportement anormal, des dysfonctionnements moteurs, voire la démence. Les macrophages infectés peuvent infiltrer le SNC et provoquer une réponse neuro-pathologique de différentes cellules neuronales.

III-2 Le diagnostic

Les centres de lutte et de prévention contre les maladies, sous l'égide de l'OMS, ont établi une définition officielle pour le diagnostic du SIDA. Ce diagnostic dépend à la fois du nombre de cellules CD4⁺/mm³ de sang (on distingue trois catégories : >500 ; entre 200 et 500 ; <200) et de la présence de maladies opportunistes caractéristiques. Le diagnostic sérologique s'opère en deux étapes. La première consiste à effectuer un test de dépistage environ trois mois après le risque de contamination. La recherche des anticorps anti-VIH est réalisée par des tests ELISA. Deux essais différents sont pratiqués sur le même sérum dont l'un doit permettre le dépistage des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Si la recherche est positive, le résultat doit être confirmé par Western Blot. Il est recommandé d'effectuer le diagnostic de confirmation sur un prélèvement différent de celui de l'examen de dépistage. D'autres tests peuvent servir à diagnostiquer l'infection : la recherche de l'antigène p24, l'isolement du virus en culture et la détection du matériel génétique viral.

IV Thérapie et stratégie préventive

Depuis la mise en place de la Zidovudine (AZT) en 1986 jusqu'à aujourd'hui, l'espérance de vie des malades infectés par le VIH est passé de 10 à 36 ans en moyenne avec une nette amélioration du confort des patients et les plus âgés aujourd'hui ont plus de 80 ans. Bien que l'infection par le VIH déclenche une réponse immune de l'organisme, celle-ci ne permet pas de lutter efficacement contre cet agent pathogène. Cette faiblesse est en partie due à la très grande variabilité antigénique du virus et à l'affaiblissement du système immunitaire. Ces observations ont rendu problématique l'élaboration de vaccins capables d'inhiber l'infection et la propagation du virus.

Dès lors, la stratégie de lutte anti-VIH-1 ne pouvait se contenter d'une seule approche. Le développement et la mise en place de la trithérapie HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) a certes révolutionné le devenir des malades, cependant, on est toujours confronté à l'émergence des souches résistantes aux traitements et/ou à la persistance des virus dans les réservoirs. Ces deux principaux problèmes constituent des défis aux chercheurs pour développer des nouvelles stratégies thérapeutiques dans les décennies à venir.

IV-1 Les inhibiteurs actuellement utilisés en clinique

Les différentes étapes du cycle viral de VIH constituent la cible de différentes drogues développées et utilisées en clinique (Figure 5). Bien que les premières molécules anti VIH développées fussent dirigées contre la RT et la protéase, les chercheurs se sont vite rendus compte de l'utilité de cibler les autres étapes clés du cycle viral telles que l'entrée ou l'intégration, à cause sans doute de la capacité et de la vitesse de mutation de ce virus. Néanmoins, la RT reste actuellement la principale cible pour les médicaments utilisés en clinique en première ligne.

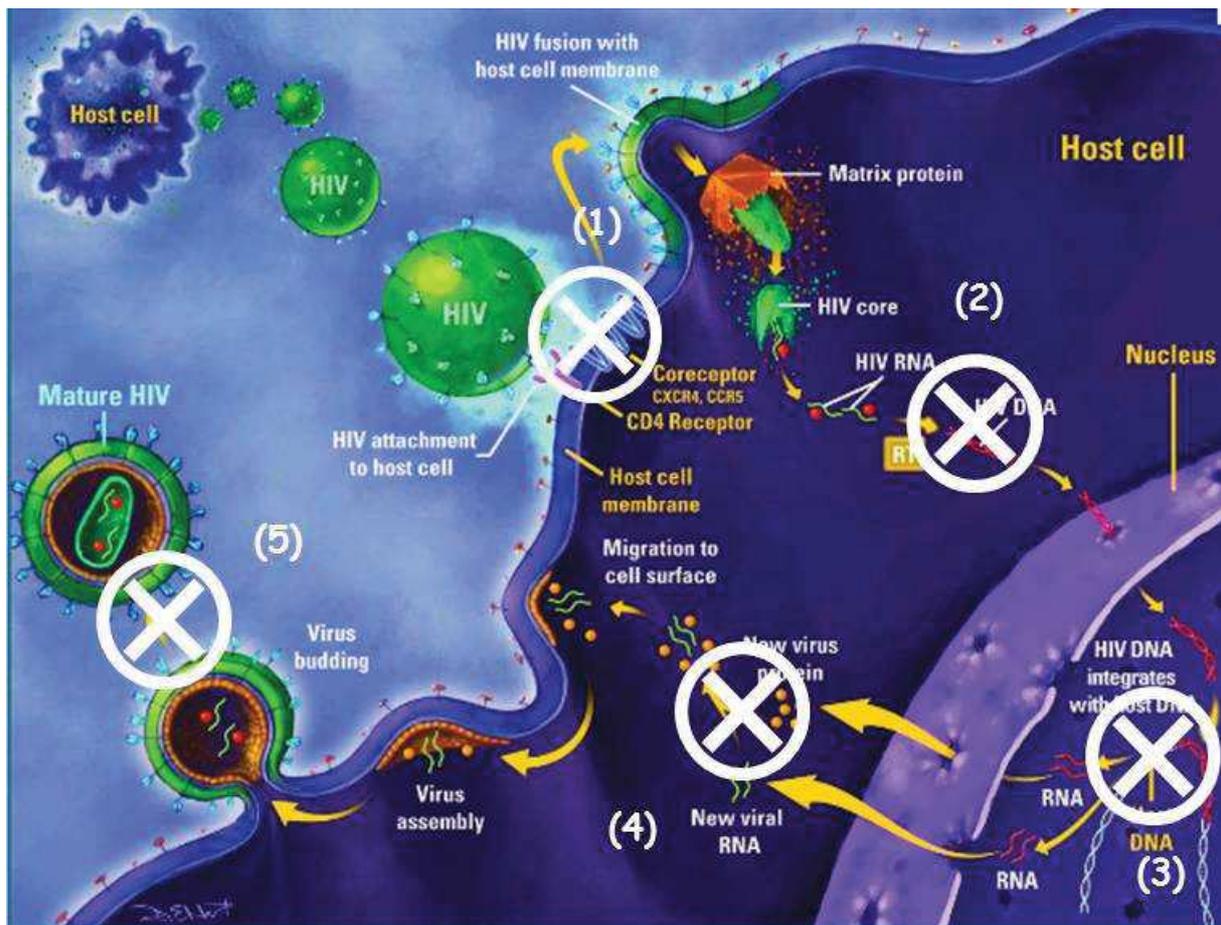


Figure 5 : Les différentes étapes ciblées par des drogues actuellement utilisées en clinique

Les Croix encadrées en blanc indiquent les étapes principalement bloquées par les inhibiteurs : (1) inhibiteurs de la fixation et de fusion du virus avec la membrane de la cellule hôte, (2) inhibiteurs de la RT, (3) inhibiteurs de l'intégrase, (4) et (5) inhibiteurs de la protéase.

IV-2 Les inhibiteurs d'entrée du VIH

Il est bien établi que le virus cible principalement le récepteur CD4 avec la gp120 et les corécepteurs CCR5 et CXR4 via la gp41 pour adhérer et fusionner avec la cellule hôte (Dorenz et al.1996; Feng et al.1996; lapham et al. 1997; Moore et al.1997). Il existe en clinique deux inhibiteurs d'entrée :

- l'Enfuvirtide (Fuzeon, T-20) un peptide qui cible la gp41 afin de bloquer la translocation du virus (Rimsky et al. 1998), mais ce peptide a été progressivement abandonné dû à sa faible biodisponibilité et au problème de la nécessité de deux injections quotidiennes (200mg / jour) (Ball an Kinchelow 2003).

- Le Maraviroc empêche la fixation du récepteur cellulaire CCR5 à ses ligands (viraux et naturels) (Esté et al. 2007).

Par ailleurs, d'autres inhibiteurs d'entrée sont en développement, tel que le cyclotriazadisulfonamide (CADA), qui empêche l'expression des récepteurs CD4 à la surface des lymphocytes, dans le but de bloquer l'attachement du virus à ces cellules (Vermeire et al. 2008 ; Demillo et al. 2011).

IV-3 les inhibiteurs de l'intégration (INIs)

L'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire est l'une des étapes clé, nécessaire à la survie et au développement du virus. Ce qui place l'intégrase, parmi les cibles importantes dans la thérapie anti-VIH. Néanmoins, très peu de molécules anti-IN sont actuellement utilisées en clinique Ceci est due à l'absence de structures cristallographiques de l'intégrase du VIH-1 complète, seule ou avec un fragment d'ADN double brin (intasome) et/ou un inhibiteur du site catalytique. Depuis 2010, on dispose de plusieurs structures cristallographiques de l'intégrase du PFV (prototype foamy virus) avec Mg ou Mn, fragment d'ADN double brin, inhibiteurs puissants (raltegravir, elvitegravir, dolutegravir, MB76 etc...). On peut s'attendre à voir émerger de nouveaux inhibiteurs du transfert de brins dans un proche avenir. Le mécanisme de l'intégration est maintenant assez bien connu et de nouvelles cibles du processus d'intégration commencent à apparaître : interaction avec le LEDGF/p75, dimérisation de l'intégrase.

Le Raltegravir (RAL) (Isentress ou MK-0518) (Figure 6) est un dérivé d'acide 4-aryl-2,4-diketobutanoic (DKA) développé par le groupe Merck pharmaceuticals et mis sur le marché en 2007. Il est actuellement utilisé en clinique et bloque la seconde activité catalytique de l'intégrase, c'est-à-dire le transfert de brin (Marowitz et al.2007). Le Raltegravir permet de

moduler le traitement des patients confrontés aux résistances contre les médicaments et donc de palier aux mutations de résistantes de la RT. Cependant, son utilisation à long terme induit aussi l'émergence de mutations résistantes dans le gène de l'IN (Charpentier et al. 2008) telles que E92QV/N155H, T97A/Y143CHR et G140CS/Q148HKR (Malet et al. 2008 ; Garrido et al. 2008). Dans cette première génération d'INIs, l'Elvitegravir (EVG) (GS-9137) qui n'est pas un DKA, mais un mono-keto acide développé initialement par le groupe japonais Tobacco Company est actuellement commercialisé par le groupe Gilead Sciences en cocktail de molécules sous le nom de STRIBILD (elvitegravir, cobicistat, emtricitabine, tenofovir disoproxil fumarate). 1 inhibiteur de l' IN, deux inhibiteurs de RT et un booster (pour augmenter la biodisponibilité d'Elvitegravir)

Une deuxième génération d'inhibiteurs d'IN est en développement, parmi les quels le Dolutegravir DTG (S/GSK 1349572) qui est en phase clinique III, est actuellement développé chez Shiniogi-ViiV Healthcare-GlaxoSmithKline (Kobayashi et al. 2011 ; Wainberg et al. 2012). Le DTG a l'avantage d'être efficace sur les mutations de résistance aux inhibiteurs de la première génération tout en présentant une moindre toxicité en comparaison de ces derniers (Wainberg et al. 2012) . D'autres molécules anti-Intégrase sont en cours de développement pour surmonter le problème d'apparition de souches mutantes résistantes, c'est le cas de 2-Hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones (HIDs) ou MB-76, qui s'est avéré efficace sur les mutants résistants au RAL (Desimmie, B et al. 2013)

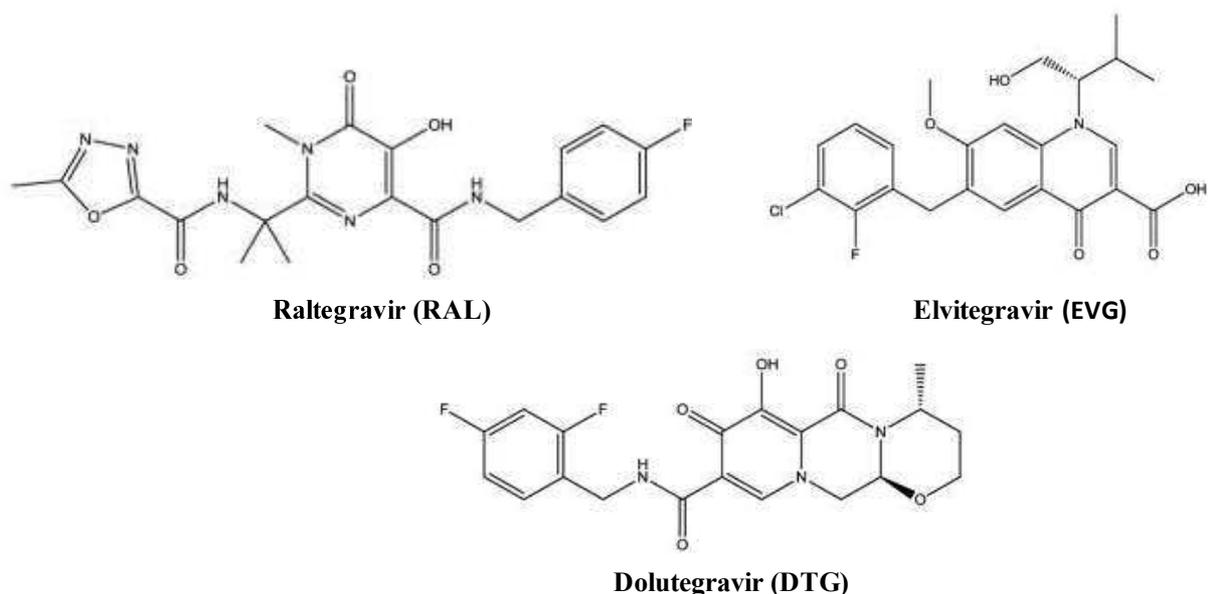


Figure 6 : Structure chimiques des principaux inhibiteurs d'intégrase (INIs)

IV-4 Les inhibiteurs de protéase (IPs)

Les inhibiteurs de protéases ont permis un progrès majeur dans la lutte anti VIH. En effet, ils inhibent l'activité protéase du VIH et se montrent particulièrement efficaces lorsqu'ils sont utilisés en association avec des inhibiteurs nucléosidiques de la RT (NRTIs).

Ces inhibiteurs de protéases sont spécifiques et provoquent la production de virions immatures non actifs et incapables d'infecter des cellules cibles. Contrairement aux NRTIs, les IPs n'ont pas besoin d'activation métabolique dans la cellule et sont donc opérationnels, même quand la cellule est au repos (Jamjoom et al. 1991). Les IPs sont des pseudo-peptides analogues structuraux de la séquence peptidique du site de clivage reconnu par la protéase. Ils s'insèrent au site catalytique, à l'interface des deux sous-unités du dimère qui constituent l'enzyme, et bloquent son activité protéolytique de façon sélective et réversible.

Les inhibiteurs de protéase actuellement disponibles sont l'indinavir (CRIXIVAN), le ritonavir (NORDIR), le nelfinavir (VIRACEPT), le saquinavir (accessible sous deux formes (INVIRASE, FORTOVASE), le lopinavir/ritonavir (KALETRA), l'atazanavir (REYATAZ), le fosamprenavir (TELZIR). Tipranavir (APTIVUS) et darunavir (PREZISTA) sont les deux derniers nés de cette classe de médicament (Figure 7). Ces inhibiteurs inhibent la protéase du VIH de type 1 et 2 (saquinavir, ritonavir), ou préférentiellement de type 1 (indinavir, nelfinavir) (Vella et al.1995; Adjé-Touré et al. 2003; Witvrouw et al. 2004 ; Jana et al.2009).

Divers effets indésirables peu spécifiques : troubles digestifs, neurosensoriels, cutanés parfois graves, ont été répertoriés. Un autre effet indésirable est l'apparition d'une résistance croisée aux inhibiteurs des protéases. L'indinavir peut donner une lithiase urinaire par cristallisation se traduisant par des douleurs lombaires avec ou sans hématurie.

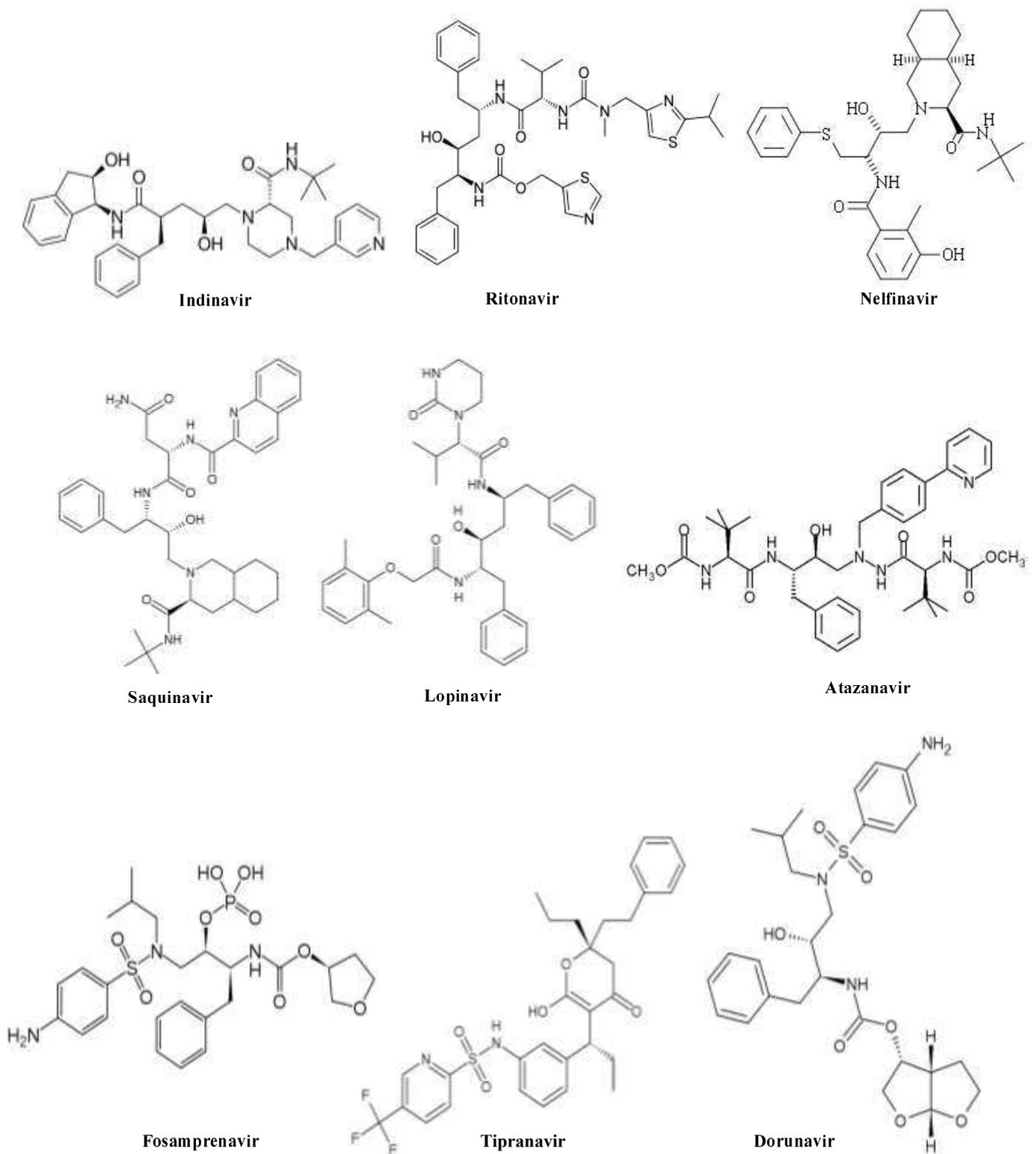


Figure 7: Structure chimique des principaux inhibiteurs de protéase (IPs)

IV-5 Les inhibiteurs de la Reverse Transcriptase RT

La RT est la cible principale des thérapies anti-VIH développées pour combattre l'infection virale. Deux classes d'inhibiteurs de la RT sont actuellement utilisées en clinique :

- Les inhibiteurs nucléosidiques (NRTIs) tel que la zydovudine (AZT), qui sont des analogues nucléosidiques terminateurs de chaîne, et bloquent l'élongation de l'ADN.
- Les inhibiteurs non nucléosidiques (NNRTIs) comme l'Efavirenz (EFV), qui sont des inhibiteurs conformationnels, bloquant la RT dans une conformation non processive.

Enfin, des nouvelles molécules capables de cibler l'activité RNase H de la RT, ou, en même temps les deux activités de la RT, sont actuellement en développement, c'est le cas du BBNH (Borkow et al.1997) (Esposito et al. 2012) (Figure 8). Cette partie sera développée en détail dans le Chapitre II de ce manuscrit.

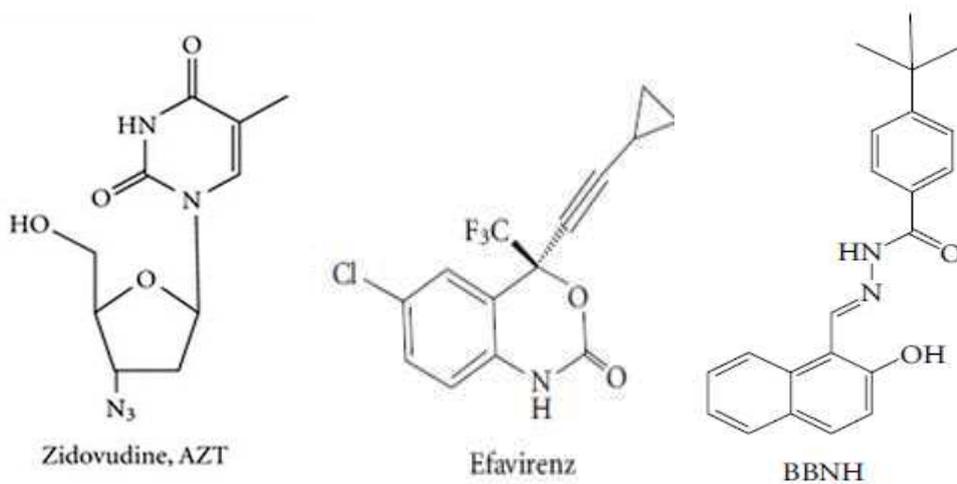


Figure 8 : Trois exemples d'inhibiteurs de la RT

L'AZT est un NRTI et l'EFV et le BBNH sont des NNRTI

La Reverse Transcriptase du VIH-1

La Reverse Transcriptase (RT) constitue l'enzyme multifonctionnelle clé au sein du complexe de reverse transcription (RTC), catalysant les deux activités ADN polymérase dépendante d'ARN et ADN polymérase dépendante d'ADN ainsi que l'activité RNase H, nécessaires à la conversion d'ARN viral simple brin en double brins d'ADN (Telesnitsky et al. 1997 ; Le Grice et al. 1993 ; Katz et al. 1994 ; Liu S et al. 2010). La RT joue un rôle central dans la réplication du virus, c'est pourquoi elle constitue la cible principale des traitements thérapeutiques du SIDA (Richman et al. 1996; P. miak et al. 2002; Esnouf et al. 1995). Les inhibiteurs de RT-VIH-1 actuellement utilisés, sont dirigés contre l'activité polymérase de cet enzyme et, selon leur mécanisme moléculaire, ils sont repartis en deux classes principales; les inhibiteurs Nucléosidiques de la RT (NRTI) tel que l'AZT qui agissent en tant que terminateurs de chaîne et les inhibiteurs non nucléosidiques (NNRTI) tel que la Nevirapine qui sont des inhibiteurs conformationnels (De Clercq et al. 2002). L'une des limitations majeures des inhibiteurs de la RT actuellement administrés en clinique, incluant les deux classes d'inhibiteurs nucléosidiques (NRTI) et non nucléosidiques (NNRTI), est l'émergence rapide des souches résistantes (De Clercq et al. 2004). La combinaison de plusieurs facteurs tels que la faible fidélité de l'activité ADN polymérase, le niveau d'erreur élevé de la RT, associé à un important taux de réplication virale, conduit à une variabilité génétique élevée du VIH, ce qui est la cause de l'émergence rapide de résistance aux médicaments (De Clercq et al. 2004; Coffin et al. 1995).

I Mécanisme et fonction de la RT

Après la fusion des particules virales (VIH-1) avec la surface des cellules cibles, la capsidie du virus est libérée dans le cytoplasme de la cellule hôte et migre en se dégradant progressivement le long du réseau des microtubules vers le noyau. Le déshabillage de la capsidie commence en même temps que s'effectue la retro-transcription dans le complexe de reverse transcription pour laisser place au complexe de pré-intégration (PIC) (McDonald et al. 2002 ; Arhel et al. 2006). La conversion de l'ARN génomique simple brin du virus en ADNdb compétant pour l'intégration, est appelé rétro-transcription (Figure 9). Ce processus est caractéristique de tous les rétrovirus, et son accomplissement requiert les composants viraux ainsi que des éléments cellulaires, parmi lesquels le plus important, la protéine virale RT (Esposito et al. 2012).

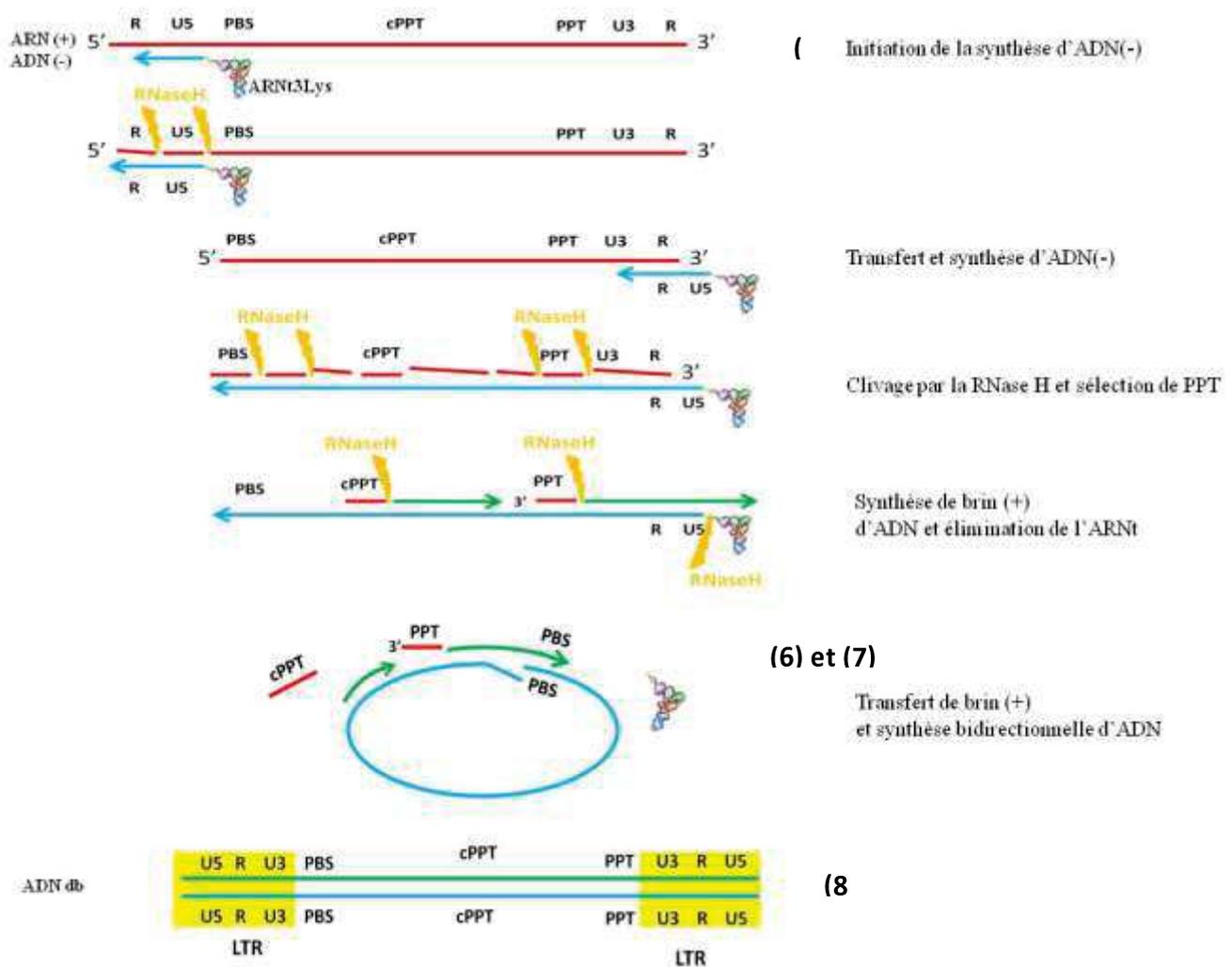


Figure 9 : Processus de la reverse transcription, d'après (Gotte, Li, et Wainberg, 1999; Esposito et al.2012)

Etape 1 : l'ARNt³^{Lys} de la cellule hôte s'hybride au PBS à proximité de l'extrémité 5'-terminale du brin (+) d'ARN génomique du virus (en rouge). La synthèse du brin d'ADN(-) (en bleu) commence en utilisant l'ARNt³^{Lys} comme amorce, et se poursuit jusqu'à l'extrémité 5'-terminale de l'ARN génomique. **Etape 2 :** la RNase H hydrolyse la portion d'ARN de l'hybride ARN/ADN libérant ainsi le morceau de l'ADNs(-) lié à l'ARNt³^{Lys}. **Etape 3 :** transfert du brin d'ADN(-) vers l'extrémité 3'-terminale de l'ARN où il est hybridé avec la séquence complémentaire R et s'ensuit l'élongation du brin d'ADN(-). **Etape 4 :** après la synthèse de l'ADNs(-), la fonction RNase H clive en plusieurs morceaux l'ARN viral hybridé à l'ADN tout en laissant intact 2 séquences spécifiques (cPPT et 3'PPT) résistantes au clivage de la RNase H. **Etape 5 :** la synthèse du brin d'ADN(+) (en vert) est initiée en utilisant les PPTs comme amorces. **Etapes 6 :** la RNase H hydrolyse les segments de PPTs et la jonction entre l'ADN et l'ARNt³^{Lys} libérant la séquence PBS du brin d'ADN (+). **Etape 7 :** transfert de brin de la séquence PBS du brin d'ADN(+) qui s'hybride à la séquence PBS complémentaire du brin d'ADN (-), ensuite la synthèse d'ADN(+) se poursuit. **Etape 8 :** le produit de cette synthèse est un double brin d'ADNdb linéaire terminé en chacune de ces extrémités par une séquence « Long Terminal Repeat » (LTR).

II Processus de reverse transcription

Chaque particule de VIH contient deux copies d'ARN positif simple brin ((+)ARNsb) dont la séquence du génome est de 9,2 kb (Ratner et al. 1985) codant pour des protéines structurales et non structurales et ayant, en 5' et 3' terminales, deux séquences identiques (LTR). Près de l'extrémité 5' du génome viral se trouve un segment de 18-nucléotides, appelé site de fixation d'amorce «Primer Binding Site» (PBS), qui est complémentaire aux 18 derniers nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARNt₃^{Lys}. Lorsque l'ARNt cellulaire est hybridé au site PBS, il sert d'amorce, et l'activité d'ADN polymérase de RT peut initier la synthèse du premier brin d'ADN(-) en utilisant l'ARN génomique viral comme matrice (figure 9).

Après l'élongation de l'ARNt jusqu'au 5'terminal de l'ARNsb, il y a un premier arrêt de la synthèse d'ADN(-) "(-)strand strong-stop DNA". A l'issue de cette synthèse, on obtient alors l'hybride ARN/ADN, un substrat de la fonction ribonucléase H (RNase H) également associée à la RT. La RT dégrade alors sélectivement le brin d'ARN de l'hybride ARN/ADN (Hughes et al. 1998), laissant ainsi le brin libre d'ADN(-) naissant s'hybrider avec la séquence complémentaire de l'extrémité 3' de l'un des deux ARNsb génomiques viraux. Par conséquent, il y a un transfert de brin de la région R du 5'terminal vers son équivalent 3'terminal du génome "(-) strand transfert" (Figure 9).

Après cette étape appelée transfert du brin négatif, la synthèse du brin d'ADN(-) peut redémarrer à partir de «3' terminal l'ARN viral et continuer le long de celui-ci. Alors que la synthèse d'ADN suit son cours, la fonction RNase H clive le brin d'ARN de l'hybride ARN/ADN en de nombreux points. Bien que la plupart des clivages de l'ARN par la RNase H ne semble pas avoir de séquence spécifique, il existe deux séquences riches en purine, connues sous le nom de voie polypurine (PPT : PolyPurine Tracts), qui sont résistantes au clivage de la RNase H et restent hybridées avec le brin d'ADN(-) naissant. Ces deux fragments d'ARN bien définis sont situés dans la partie centrale du génome du VIH-1. En particulier, le 3'-terminal du PPT va servir d'amorce pour la synthèse du brin(+) d'ADN viral et définir ainsi le 5'-terminal de cet ADN(+) (Huber et al. 1990; Rausch et al. 2004). La synthèse du brin (+) d'ADN continue jusqu'à l'extrémité 5' du brin (-) d'ADN, en utilisant en plus, la séquence des 18 nucléotides du PBS de l'ARNt en tant que matrice. De façon importante, la 19ème base en partant du 3'-terminal de l'ARNt₃^{Lys} est une Adénine méthylée (A^{méthyl}), et la présence de cette base modifiée bloque la progression de RT, générant ainsi un arrêt de la synthèse du brin d'ADN(+) "(+) Strand Strong stop DNA". Par la suite, la fonction RNase H clive le segment d'ARNt attaché au brin d'ADN(-) (ARNt-ADN(-)), et cet ARNt se

déshybride de l'ADN(+) libérant ainsi la séquence PBS du brin (+) de l'ADN, qui va aller s'hybrider le site complémentaire sur le 3' terminal du brin (-) d'ADN (V. P. Basu et al. 2008). Puis, une synthèse bidirectionnelle est engagée pour compléter la reverse transcription du genome virale en double brin d'ADN. La synthèse de l'ADN(+) en se poursuivant entraîne un déplacement d'environ 90 nucléotides de l'amorce PPT centrale et ce fragment déplacé est rabattu au centre créant ainsi un "central flap"(Sarafianos et al. 2009). Cette situation inhabituelle est sans doute résolue par des mécanismes de la cellule hôte. Un candidat pour cette élimination de rabat est la "Flap Endonucléase-1" (FEN-1) (Rausch et al. 2004). l'étape de l'arrêt de synthèse du brin d'ADN(+) au niveau de l'ARNt^{3Lys} est controversé. En effet les informations reportées dans la revue de Le Grice et al. 2012 suggèrent que la synthèse du premier brin d'ADN(+) continue le long de la matrice ADN(-)-ARNt^{3Lys} jusqu'au blocage du complexe de réplication à une position correspondant à la première base modifiée de l'ARNt^{3Lys}(A57). En ce moment, le C-terminal de la RNase H est positionnée sur la jonction ADN(+)-ARNt^{3Lys} et la dégradation de l'Amorce ARNt^{3Lys} favorise le transfert du brin d'ADN(+) aidé par l'homologie entre les PBS des brins d'ADN(+) et (-). Enfin, un clivage spécifique élimine les amorces PPT et expose la séquence d'intégration pour faciliter l'insertion de l'ADNdb viral dans le chromosome de la cellule hôte.

III Organisation Structurale.de la RT

La RT a fait l'objet d'exhaustives caractérisations structurales et fonctionnelles à travers des études de structure cristallographique, des essais biochimiques et des analyses moléculaires. La RT présente une organisation structurale asymétrique très dynamique qui est nécessaire à l'enzyme. Cette conformation lui permet de faire la différence entre les substrats d'acides nucléiques afin de les placer correctement sur le site polymérisique pour la synthèse, d'ADN dépendant d'ARN et d'ADN, ou sur le site catalytique de la RNase H pour la dégradation du brin d'ARN hybridé à l'ADN (Liu S et al.2010 ; Abbondanzieri et al.2008; Divita et al. 1995c). Les structures des RTs du VIH-1 et du VIH-2 ont été déterminées dans différentes conditions et états conformationnels (Kohlstaedt et al. 2008; Huang et al.1998; Rodgers et al.1995; Esnouf et al. 1995; Jacobo-Molina et al.1993) en présence ou en absence de substrats ou d'inhibiteurs. Ces études ont fait ressortir les traits importants de la structure et de la fonction de ces enzymes. Plus de 30 structures différentes ont été établies (Chung S et al.

2013). La RT du VIH-1 est un hétéro-dimère constitué d'une sous-unité catalytique (p66 : 66 kDa) et d'une sous-unité régulatrice (p51 : 51 kDa) ; p51 dérivant de p66 par clivage protéolytique d'un fragment en C-terminal correspondant aux résidus 427 à 560 constituant le domaine RNase H. Ces deux sous-unités (p66 et p51) ont en commun 4 sous-domaines qui sont, "fingers, palm, thumb et connexion" adoptant une structure forme de main droite, caractéristique classique des polymérases (Figure 10). Ces sous-domaines sont répartis de façon linéaire comme suit :

- le domaine fingers résidus 1-85 et 118-155,
- le domaine palm, résidus 86-117 et 156-237,
- le domaine thumb, résidus 238-318,
- le domaine de connexion, résidus 319-426
- et en fin le domaine RNase H résidus 427-560 uniquement sur la p66 (Kohlstaedt et al. 1992; Jacobo-Molina et al. 1993) (Figure 10).

En dépit du fait que les différents domaines sont structurés de façon similaire dans les deux sous-unités p66 et p51, leurs agencements spatiaux diffèrent complètement. L'arrangement spatial des domaines de la polymérase laisse apparaître une remarquable asymétrie entre les deux sous-unités. Le site catalytique de p51 est totalement inactif, car il est profondément enfoui dans la molécule du fait que la sous-unité p51 adopte une conformation compacte. Contrairement, la sous-unité p66 présente les sites actifs de la polymérase et de RNase H dans des structures moins condensées et ouvertes. Le site actif de la polymérase contient la large fente au niveau du sous-domaine palm et exposant le site de liaison des acides nucléiques. Des motifs hautement conservés dans les domaines fingers et palm de p66, ajoutés au domaine thumb, agissent comme une pince pour favoriser le bon positionnement de l'amorce/matrice (primer/template : p/t). Le "primer grip" est l'un de ces motifs, qui est responsable du positionnement correcte de l'extrémité 3' de l'amorce dans le site actif de la polymérase, et est impliqué dans la translocation de l'amorce/matrice, suite à l'incorporation d'un nucléotide.

Bien que la sous-unité p51 joue un rôle structural prédominant dans l'hétéro-dimère RT, elle est aussi pleinement impliquée dans le chargement de la sous-unité p66 sur l'amorce/matrice (p/t) et dans le maintien de la conformation adéquate de l'enzyme, lors de l'initiation de la transcription inverse (Kohlstaedt et al. 1992 ; Chung, S et al. 2013).

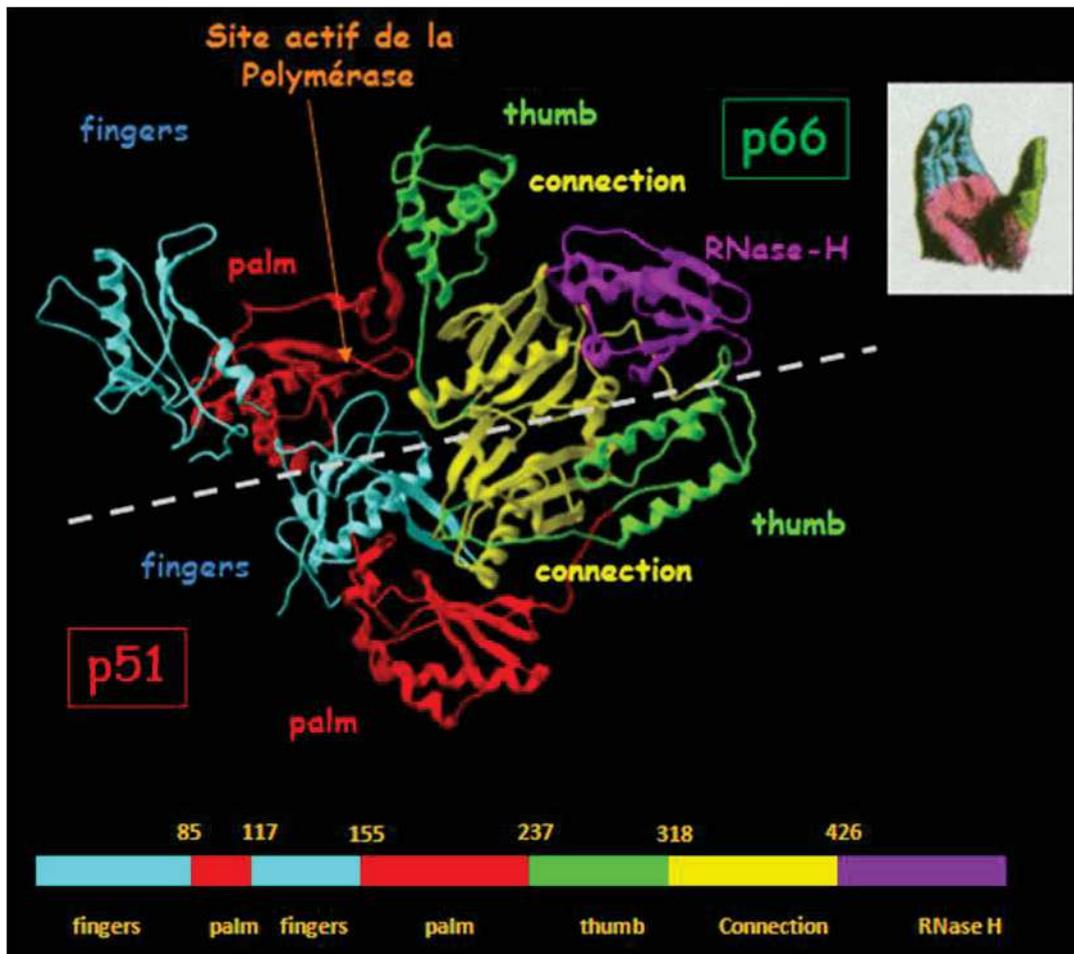


Figure 10 : Structure de la Reverse Transcriptase du VIH-1

La forme active de l'enzyme est un hétéro-dimère formé par les sous-unités p66 et p51 délimitées par des points tirés blancs. La sous-unité p66 comporte les domaines fingers (en bleu résidus 1-85 et 118-155), palm (en rouge résidus 86-117 et 156-237), thumb (en vert résidus 238-318) formant le site catalytique de la polymérase, le domaine connexion (en jaune résidus 319-426) et le domaine RNase H (en magenta résidus 427-560) qui est absent sur la sous unité p51. La RT adopte une structure en main droite caractéristique classique des polymérases (Jacobo-Molina et al.PNAS,1993,90,6320).

III-1 L'hétéro-dimère RT

Le dimère de la RT présente une large interface entre les deux sous-unités, d'environ 4800 Å² enfouis dans le complexe dimérique de la RT, avec plus de 80% qui correspondent à des atomes non polaires (Wang et al. 1994). D'un point de vue des interactions protéine/protéine,

l'énergie de liaison n'est pas répartie équitablement le long de l'interface du dimère, mais localisée sur un petit nombre de résidus communément appelés « hot spots », et qui jouent un rôle essentiel dans la stabilisation de l'interaction protéine-protéine (Figure 11) (Srivasta et al. 2006 ; Wang et al.1994 ; Tachedjian et al. 2000 ; 2003). Les résidus responsables de l'association des 2 sous unités sont localisés dans trois clusters hydrophobes, constituant la plus importante contribution d'énergie d'interaction totale entre les deux sous-unités (Figure 11). Dans la sous-unité p66, les résidus impliqués dans la formation de l'interface du dimère, sont localisés dans les domaines fingers, palm, connexion et RNase H, tandis que dans la sous-unité p51, ils se trouvent dans les domaines fingers, thumb et connexion. La région du domaine palm de p66 (résidus D86-L92), interagit avec deux régions de fingers de p51 (résidus P52-P55 et S135-P140). Les résidus de RNase H (P537 - E546) de la sous-unité p66, interagissent avec les résidus du domaine thumb (I280-G290) de la sous-unité p51, et les résidus (W406-W410) du domaine connexion de p66 avec les résidus (P392-W401) du domaine connexion de p51 (Figure 11) (Wang et al.1994 ; Divita et al.1995a). Le domaine connexion de la RT comporte un "cluster" de résidus riche en tryptophane hautement conservé sur VIH-1 et VIH-2, mais aussi dans les RTs des virus de l'immunodéficience simien SIV (résidus 398-414) localisé à proximité de l'interface du dimère RT. Ce motif de tryptophanes est composé des résidus W398, W401, W402, W406, W410, et W414 qui représentent « les hot spots » d'interaction entre les sous-unités de la RT et sont responsables du mécanisme de dimérisation (Tachedjian et al. 2000 ; 2003 ; Divita et al. 1995a ; 1995b). Les contacts entre les deux domaines de connexion sont intrinsèquement asymétriques et forment les seules interactions entre domaines homologues des deux sous-unités.

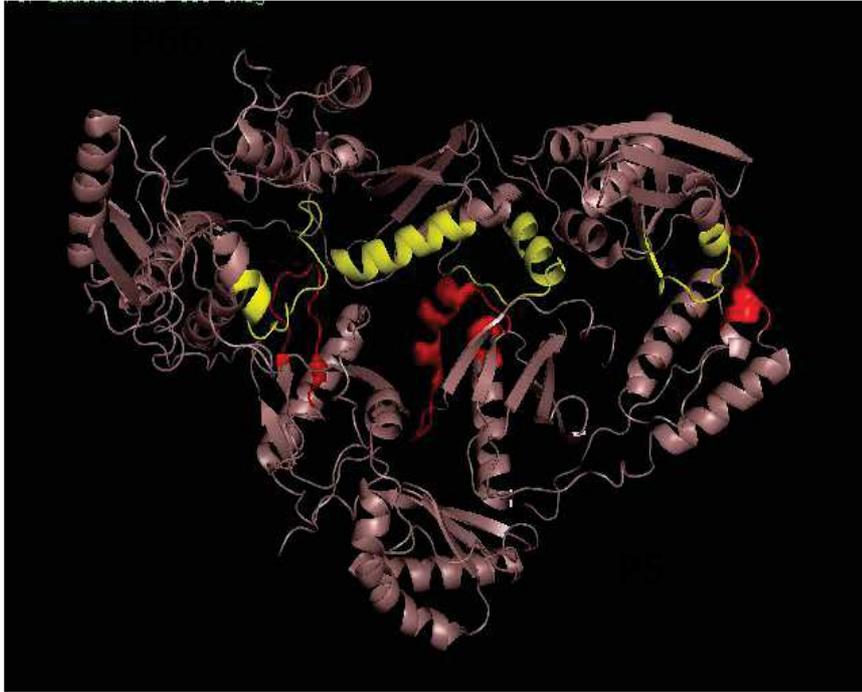


Figure 11 : Représentation des "hotspots" à l'interface p66/p51

En jaune les résidus de la sous unité p66 et en rouge ceux de la sous unité p51 impliqués dans l'interaction des 2 sous unités et la stabilité de l'hétérodimère. (Les coordonnées de la structure cristallographique utilisée proviennent de RCSB Protein Data Bank code 1HMY, 1RTJ et la figure est générée en utilisant le logiciel PyMol version 0.93 Delano WL Scientific).

III-2. Mécanisme fonctionnel de la RT

La RT est formée de p66 et p51 qui partagent des acides aminés en commun et qui sont combinées dans un hétéro-dimère asymétrique stable (Divita et al.1995a). L'analyse de la structure cristallographique de RT montre que la sous unité p66 est composée de deux domaines spatiaux distincts, le site polymérase et le domaine RNase H (Figure 12).

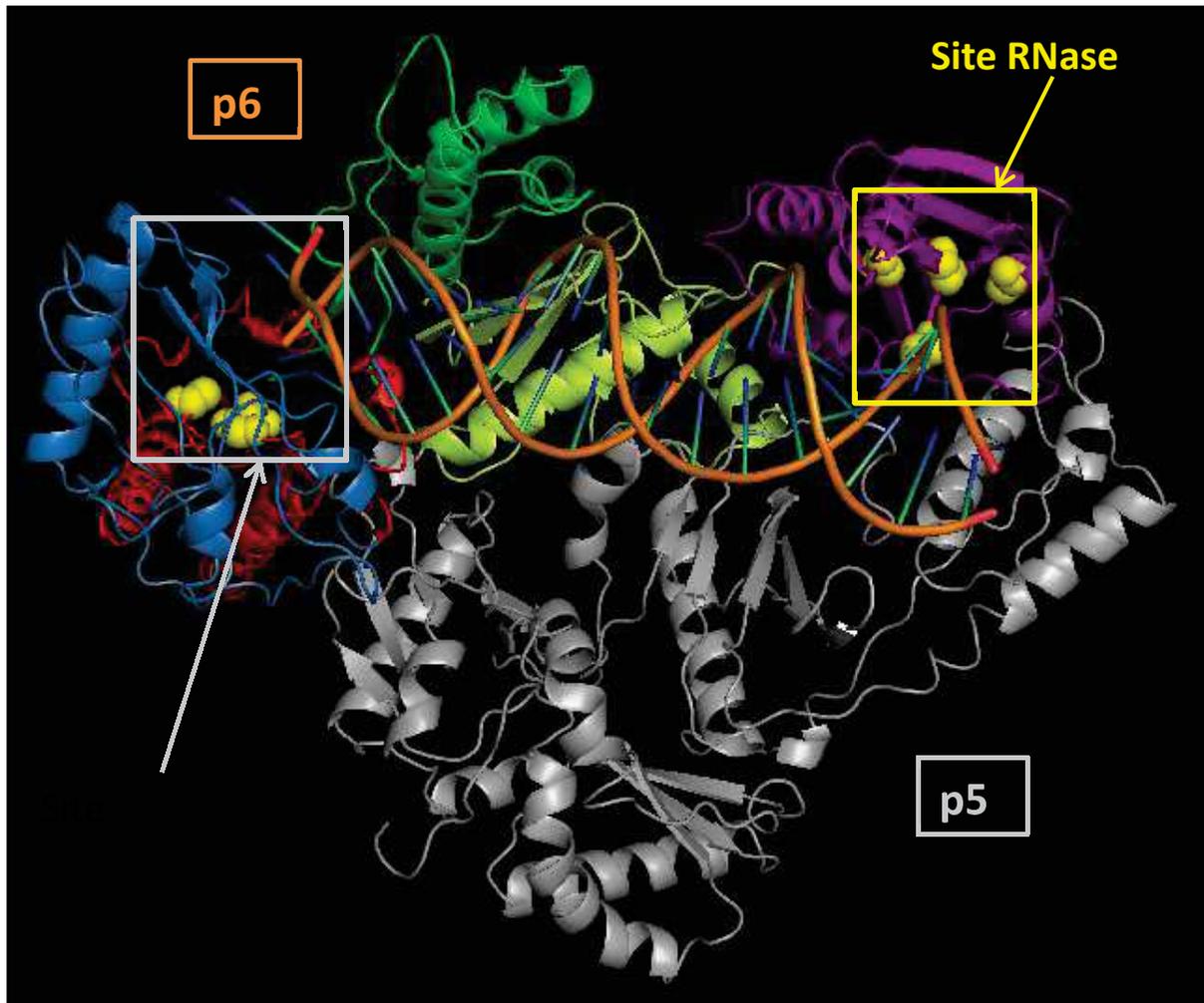


Figure 12 : Les sites catalytiques de la RT

La sous-unité p66 comporte à elle seule les deux sites catalytiques de la RT: le site de l'activité polymérase avec les principaux résidus qui y sont impliqués, encadré en blanc et le site de l'activité RNase H encadré en jaune (les coordonnées de la structure cristallographique utilisée proviennent de RCSB Protein Data Bank code 1HMV, 1RTV et la figure est générée en utilisant le logiciel PyMol version 0.93 Delano WL Scientific).

RT est principalement responsable des activités clés et distinctes, qui sont toutes indispensables pour le processus de rétro-transcription: La synthèse d'ADN dépendante d'ARN et d'ADN, l'activité RNase H, le transfert de brin, et la synthèse-déplacement de brin (Liu et al. 2008). La présence de toute ces fonctions dans une même et seule protéine est facilitée par la nature hautement dynamique de la RT. Cette enzyme a la spontanéité de polymériser plusieurs nucléotides le long de matrice d'ARN ou d'ADN (Liu et al. 2008, 2010 ; Abbondanzieri et al. 2008). La RT peut lier les substrats d'acides nucléiques dans deux

orientations différentes, appelées "orientation de clivage RNase H compétente" et "orientation de polymérase compétente". Chacune d'entre elles permet de catalyser l'une des deux activités enzymatiques associées à la RT (Abbondanzieri et al. 2008 ; Liu S et al. 2010). Ces deux modes de liaison sont dans un équilibre dynamique, et il a été démontré que RT peut spontanément et rapidement basculer entre ces deux orientations sans se dissocier du substrat. Ces retournements peuvent être influencés par la présence des nucléotides qui stabilisent l'orientation polymérase-compétente ou aussi par les inhibiteurs qui, à l'inverse, la déstabilisent (Rausch et al. 2004). Cette réorganisation structurale spontanée du complexe RT-substrat permet potentiellement à l'enzyme d'explorer rapidement les différents sens de liaison qui déterminent ses fonctions distinctes augmentant ainsi l'efficacité de la réplication (Abbondanzieri et al. 2008).

III-2.1 La synthèse d'ADN ARN dépendante et ADN dépendante

La synthèse d'ADN, catalysée par les deux activités d'ADN polymérase dépendante d'ARN et d'ADN associées à la RT, se produit par un mécanisme similaire à celui des autres ADN polymérases (Steltz et al. 1998). Le site actif de la polymérase est localisé au milieu des sous-domaines 'palm, fingers et thumb' de la p66 (Figure 12). Le sous-domaine palm est très important pour le positionnement de l'extrémité d'amorce dans la bonne orientation pour une attaque nucléophile sur un dNTP entrant (Gosh et al. 1996) Trois résidus d'acides aspartiques (D110, D185, et D186) situés dans ce sous-domaine palm de p66 fixent le cofacteur d'ion divalent (Mg^{2+}) à travers leur groupe des carboxylates catalytiques et sont essentiels pour la catalyse (Figure 13) (Sarafianos et al. 2009).

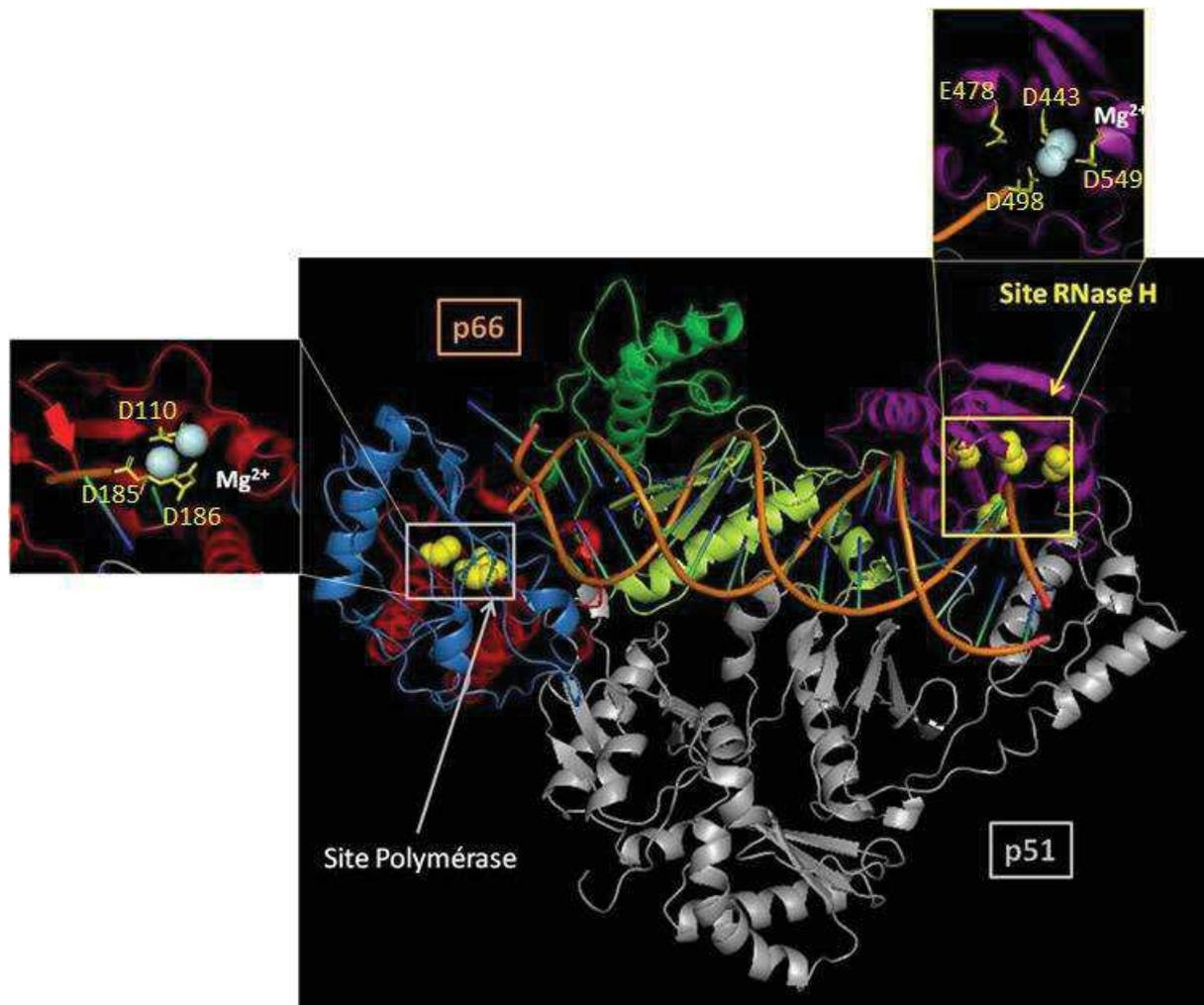


Figure 13 : Localisation des ions Mg^{2+} essentiels dans les sites catalytiques

Le zoom au niveau des sites catalytique de la polymérase (cadre blanc) et de la RNase H (cadre jaune) montre la présence d'ion Mg^{2+} (boules bleu claire) associés quelques résidus importants et indispensables pour l'activité de ces sites.

La synthèse d'ADN nécessite que la RT se fixe à l'amorce/matrice (p/t) via le site de liaison PBS. Cette interaction est stabilisée par le changement de conformation du domaine thumb de la p66 qui s'écarte du domaine fingers (de la forme fermée à la forme ouverte de RT). Ensuite, le dNTP se fixe au site de liaison nucléotidique et forme un complexe ternaire RT/ADN/dNTP (Kellinger et al. 2010). Par la suite, un changement conformationnel du domaine fingers accroche le dNTP en alignant avec précision l' α -phosphate du dNTP et le 3' OH de l'amorce à l'intérieur du site actif de la polymérase. Sous ces conditions, l'enzyme catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre le 3'-OH de l'amorce et le dNMP. Puis, le pyrophosphate est libéré hors du site catalytique. Enfin, la translocation de la forme allongée de l'amorce d'ADN libère le site de fixation des nucléotides pour accueillir le prochain dNTP entrant ou bien, la RT peut alternativement se dissocier du complexe.

En comparaison des ADN polymérase cellulaires, RT présente une très faible processivité, due généralement à une dissociation de la RT du substrat après la synthèse de quelques-uns à quelques centaines de nucléotides. Cela peut contribuer à la faible fidélité de la RT résultant en une accumulation de mutations au cours de la transcription inverse. De façon intéressante, lors de son activité ADN polymérase, la RT peut être confrontée à plusieurs structures secondaires adaptées par la matrice. En particulier, la matrice d'ARN peut former des interactions stables d'ARN/ARN qui peuvent occlure le site de polymérisation et / ou déplacer l'extrémité d'amorce. Dans ce cas, il a été montré que la RT est capable de réaliser un mouvement de glissement qui peut contribuer à la renaturation de l'ARN et à la bonne hybridation de l'amorce (Sarafianos et al. 2009).

III-2.2 Le clivage d'ARN dirigé par l'ADN

La RT est en mesure de dégrader sélectivement la portion d'ARN de l'hybride ARN/ADN, de retirer l'amorce d'ARNt et le PPT. Cette fonction de RNase H est essentielle pour la réplication du virus, sachant que sa déficience engendre des virus non infectieux (Tramontano et al. 2010). Le domaine RNase H est localisé au C-terminal de la sous-unité p66 à une distance de 60 Å du site actif de la polymérase (Figure 12) équivalent à une longueur de 17 nucléotides ADN/ADN ou à une longueur de 18 nucléotides d'hybride ARN/ADN (Nowotny et al. 2005).

Le site actif de la RNase H contient un motif hautement conservé DED comprenant les résidus carboxylates D443, E478, D498, et D549 qui peuvent coordonner et aménager deux cations Mg^{2+} divalents en une parfaite conformation géométrique pour le transfert correct du groupe phosphoryle (Rost et al. 2011). Les mutations de l'un des résidus D443, D498, E478 abolit l'activité enzymatique (Mizrahi et al. 1990; 1994). [Le domaine RNase H peut catalyser le transfert du groupe phosphoryle par des réactions de substitution nucléophile sur l'ester-phosphate. Cette action se fait par la déprotonation d'une molécule d'eau avec la production d'un ion hydroxyde nucléophile, qui va attaquer le groupe phosphate scissile sur l'ARN préalablement activé par coordination avec le cofacteur \$Mg^{2+}\$ \(Beilhartz et al. 2010\).](#)

La catalyse de l'activité RNase H peut s'effectuer dans un mode polymérase-dépendant ou polymérase-indépendant. Il est possible de distinguer trois types de clivage différents:

[Clivage dirigé par le 3'terminal d'ADN ; clivage dirigé par le 5'terminal d'ARN ; et le clivage intra-chaîne \(Chapoux et al. 2009\). Le premier clivage a lieu lors de la synthèse du](#)

brin d'ADN(-), quand le site actif de la RNase H clive l'ARN dans une position basée sur la fixation du site actif de la polymérase au 3' terminal du nouveau brin d'ADN(-) (Furfine et al. 1991). La seconde forme de clivage intervient quand RT est fixée sur le 5' terminal de l'ARN légèrement décollé et hybridé au long brin d'ADN. La fonction RNase H clive alors l'ARN sur une longueur de 13-19 nucléotides en les éliminant du 5' terminal. Le clivage intra-chaine a lieu, lorsque le clivage d'ARN est plus lent que la synthèse d'ADN, et, étant donné qu'une particule virale contient 50-100 molécules de RTs et seulement deux copies d'ARN (+), toutes les RTs qui ne polymérisent pas peuvent se lier à l'hybride ARN/ADN et dégrader le segment d'ARN par un mode de polymérase-indépendante (Ghosh et al. 1996).

III-2.3 Mécanisme de transfert de brin

Le transfert de brin est une étape cruciale du processus de transcription inverse dans lequel deux NASb (Acide Nucléiques simple brin) complémentaires doivent s'hybrider pour permettre la poursuite de la synthèse d'ADN (figure 9). Dans les deux cas de transfert de brin (-) et (+), l'ARNsb développe des structures secondaires : La région R comprend une forme structurée à motifs TAR en épingle à cheveux et un poly (A) en épingle à cheveux (Telesnitsky et al. 1997). En plus, la séquence PBS du 3' terminal du brin (-) d'ADN peut former une structure stable en épingle à cheveux. Par ailleurs, la RT est aidée dans l'accomplissement de cette étape par la présence des protéines de nucléocapside virale (NC) (X.Ji et al.1996; Grohmann et al., 2008). Le processus de transfert de brins, conjugué à la faible fidélité de RT et la présence des facteurs de cellule hôte tels qu'APOBEC3G (Arion et al. 1998), contribuent à expliquer le taux élevé d'événements de recombinaison qui permettent au VIH d'évoluer rapidement et de développer une résistance aux médicaments.

III-2.4 La pyrophosphorolyse

Comme les autres ADN polymérases, la RT peut catalyser la réversibilité de la réaction d'incorporation du dNTP qui est appelée pyrophosphorolyse. La RT a la capacité d'effectuer cette réaction inverse en utilisant une molécule de pyrophosphate (PPi) ou un NTP, tel que l'ATP, comme substrat accepteur (Arion et al.1998; Meyer et al. 1999) qui donne lieu à un tétraphosphate dinucléotide (formé par le dNMP excisé et le substrat accepteur ATP) avec un

3'-OH libre comme produit de la réaction. Cette fonction de RT est particulièrement importante dans certains mécanismes de résistance aux médicaments.

IV Les inhibiteurs de la RT (RTIs)

Les combinaisons de plusieurs drogues approuvés par la FDA et utilisés pour le traitement du VIH-1 comprennent deux classes d'inhibiteurs qui ciblent la RT avec deux mécanismes d'action différents. La première classe comprend des inhibiteurs nucléosidiques / nucléotidiques de la RT (NRTI / NtRTI), tandis que la deuxième classe consiste en des inhibiteurs non nucléosidiques de la RT (NNRTIs).

IV-1 Les inhibiteurs nucléosidiques/nucléotidiques (NRTI/NtRTI)

IV-1.1 Les NRTIs : Mécanisme d'action et Résistance

Les inhibiteurs nucléosidiques actuellement utilisés en clinique ressemblent structurellement à la fois aux analogues des pyrimidines et des purines (Mehellou et al.2010). Les dérivés des nucléosides pyrimidines comprennent les analogues de la thymidine tels que le 3'-azido 2',3'-didéoxythymidine (**Zidovudine, AZT**), le 2',3'-didéhydro-2', 3'-didéoxythymidine (**Stavudine, d4T**) et les analogues de la cytosine comme la [(-)-2', 3'-thiacytidine (**Lamivudine, 3TC**)], la 2',3'-didéoxycytidine (**Zalcitabine, ddC**) dont l'utilisation de longue durée n'est plus recommandée en raison de neuropathie périphérique qu'elle cause (Simpson et al. 1995), la (-)-2'-déoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine (**Emtricitabine, FTC**), et la [(-)-2'-déoxy-3'-oxa-4-thiacytidine (**dOTC**)] . Les nucléosides analogues des purines incluent le (1S-4R)-4-[2-amino-6(cyclopropylamino)-9H-purin-9yl]-2-cyclopentane-1-methanol (**Abacavir, ABC**) et la 2',3'-didéoxyinosine (**Didanosine ddl**) comme analogues de guanosine et d'adénosine respectivement (Mehellou et al. 2010) (Figure 14).

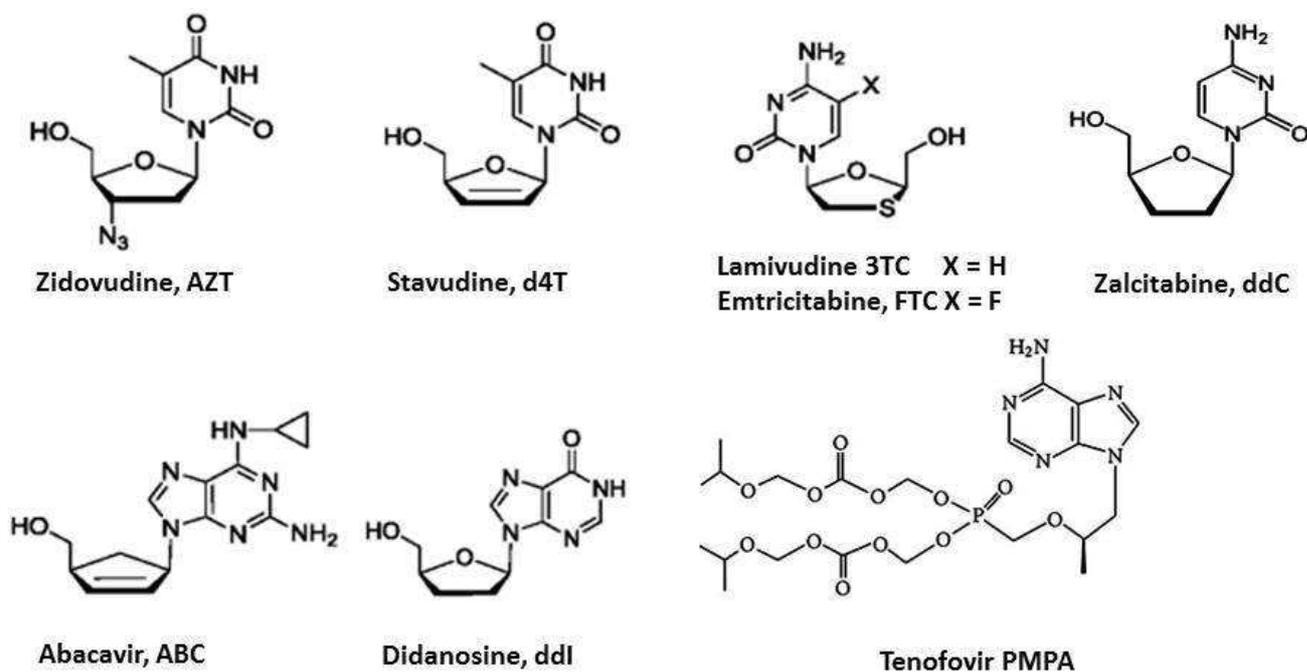


Figure 14 : Structure chimique des NRTI et NtRTI utilisés en clinique

Dans le but d'inhiber la RT, ces composés doivent être phosphorylés en leur forme triphosphate par les kinases cellulaires. Tous les NRTIs passent par le même mécanisme pour inhiber RT : une fois activés sous forme triphosphate, ils sont incorporés dans l'amorce grandissante entrant ainsi en compétition avec les dNTPs naturels et terminant ainsi la synthèse d'ADN en raison de l'absence du groupe 3'-hydroxyle (-OH) (Figure 15).

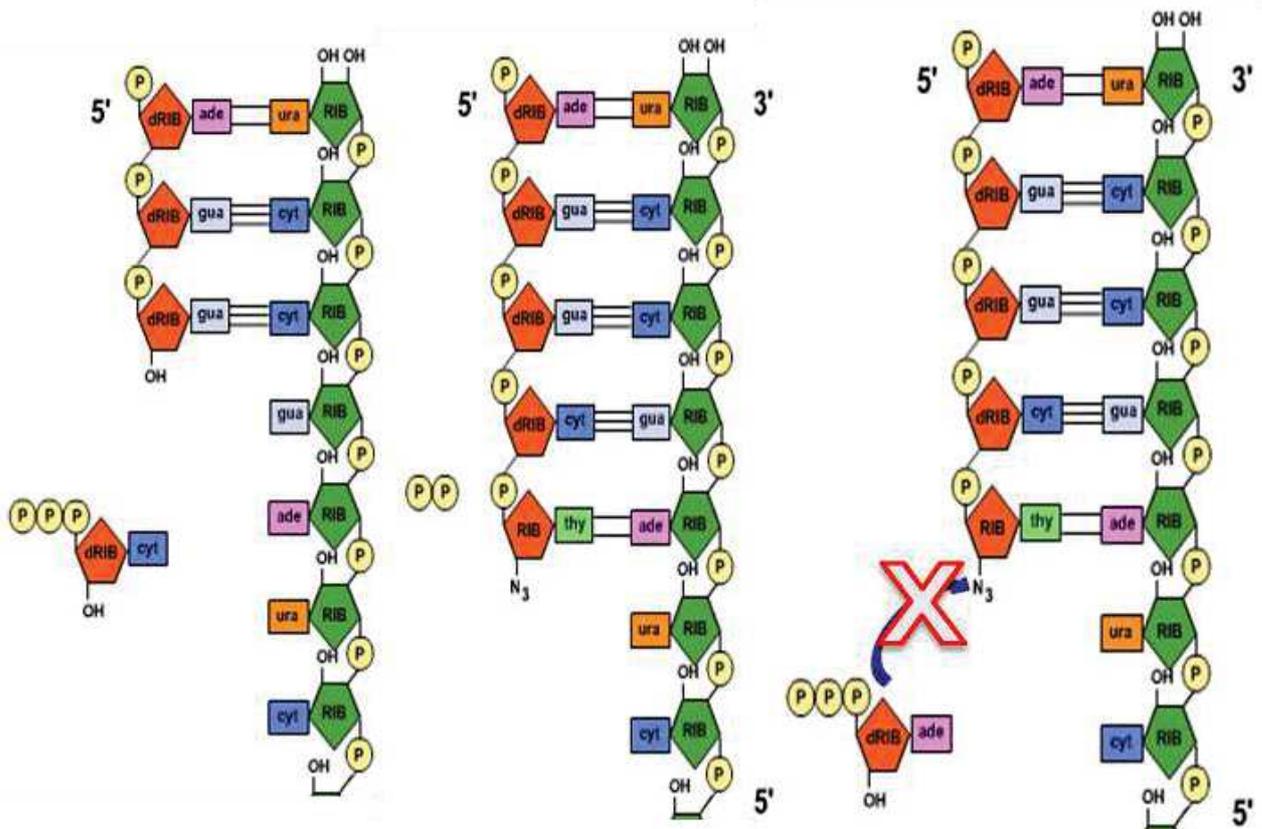


Figure 15 : Mécanisme d'action d'un NRTI agissant en tant que terminateur de chaîne.

L'élongation du brin d'ADN en rouge est bloquée après incorporation d'un analogue nucléotidique (AZT) portant en 3' un -N₃ à la place du -OH qui réagit normalement avec le triphosphate du nucléotide entrant.

Par conséquent, une fois incorporés dans l'ADNdb ils empêchent l'ajout des nucléotides entrants et agissent ainsi comme terminateurs de chaîne. De façon intéressante, la RT du VIH-1 utilise ainsi les NRTIs comme substrats.

Sous la pression sélective des médicaments, les virus mutants résistants aux drogues peuvent prendre un avantage compétitif sur le virus sauvage (WT) et devenir les souches quasi dominantes. La résistance de VIH-1 aux NRTIs implique habituellement 2 mécanismes : La discrimination du NRTI qui va réduire le niveau de son incorporation et l'excision du NRTI de l'amorce qui va en débloquent la terminaison. Un exemple simple de la discrimination, est l'encombrement stérique qui engendre une altération sélective de la liaison avec les NRTI tel que dans le cas de la mutation de résistance M184V pour la 3TC (Schinazi et al. 1993; Schuurman et al. 1995), empêchant ainsi son bon positionnement pour la catalyse (Sarafianos et al 1999). Même si le mécanisme de discrimination est moins évident pour les autres NRTIs,

lesquels sont des composés simples structurellement (par exemple ceux qui sont juste dépourvus du groupe 3'-OH) devraient être différemment reconnus ; Il a été démontré que les mutations dans le site de fixation des nucléotides, comme les mutations K65R, T69DL, L74V, V75T localisées dans la boucle β 3- β 4 du sous-domaine fingers de la p66, procurent à la RT une meilleure discrimination du triphosphate des NRTIs par rapport à celui des dNTPs naturels (Huang et al. 1998; Boyer et al. 2001). Différemment, les mutations M41L, D67N, D70R, L210W, T215F / Y, et K219Q, situées à proximité de la poche de fixation du dNTP, aussi appelées mutations analogues de la thymidine (TAMs), augmentent l'excision des NRTIs. En particulier, D67N et K70R sont les plus importantes dans l'excision de 3'-terminal des NRTIs marquant la terminaison de l'élongation d'ADN alors que T215F/Y augmente l'affinité de RT pour l'excision du substrat ATP, de telle sorte que l'excision des NRTIs est raisonnablement efficace à des concentrations physiologiques de l'ATP (Arion et al. 1998; Huang et al. 1998; Boyer et al. 2001). D'autres TAMs tels que M41L et D210W peuvent stabiliser ou compenser l'effet de T215F/Y sur poche de fixation du dNTP (N.Yahi et al. 2000), alors que la mutation K219Q pourrait augmenter la processivité de RT, pour compenser le taux élevé de suppression de nucléotides au niveau du 3'-terminale du brin d'ADN naissant (Arion et al. 1998; Meyer et al. 1999). Récemment, il a aussi été démontré que des mutations dans les domaines de connexion et de RNase H confèrent une résistance aux NRTIs (Nikolenko et al. 2007; Yap et al. 2007; Delviks-Frankenberry et al. 2007; Brehm et al. 2007; Hachiya et al. 2008). En particulier, il a été démontré que les mutations dans le domaine de connexion telles que E312Q, G354C/D, N348I, A360I/V, V365I, et A376S augmentent la résistance à l'AZT de 500 fois dans le contexte des TAMs tout en réduisant l'activité RNase H (Nikolenko et al. 2007). Ce mécanisme de résistance aux NRTIs RNase-dépendant a été proposé comme étant dû à une augmentation de l'excision de NRTI déterminée par une réduction d'activité RNase H (Yap et al. 2007). D'autre part, dans le contexte de TAMs, la mutation G333D dans le domaine de connexion, et la mutation M184V, augmentent la discrimination contre l'incorporation de 3TC-MP (Zelina et al. 2008), suggérant un mécanisme de résistance aux NRTIs RNase H-indépendant dû probablement à la nécessité d'un large contact entre la drogue et le site actif de la polymérase et à des changements conformationnels dans le domaine de connexion (Delvisk-Frankenberry 2010).

IV-1.2 Les Inhibiteurs Nucléotidiques NtRTIs

Les NtRTIs, tels que le (R)-9-(2 phosphonylmethoxypropyle)-adenine (**Tenofovir, PMPA**) (Figure 14), sont composés de telle sorte à avoir des phosphonates stables résistants à l'hydrolyse (Mehellou et al. 1999). Par conséquent, ils ont seulement besoin de deux étapes de phosphorylation pour être convertis en leurs dérivés diphosphates actifs, abrégant la voie d'activation intracellulaire et permettant ainsi une plus rapide et complète conversion en agents actifs (Balzarini et al. 1999; Squires et al. 2001). De façon similaire aux NRTIs, les NtRTIs sont phosphorylés par les enzymes intracellulaires en diphosphates et servent alternativement de substrats (inhibiteurs compétitifs). Une fois incorporés dans l'ADN viral naissant, ils agissent obligatoirement en tant que terminateurs de chaîne (Balzarini et al. 1999). Les NtRTIs tels que le Tenofovir sont considérés comme des précurseurs ou pro-drogues pour faciliter la pénétration de la membrane des cellules cibles. Par la suite, une chemolyse enzymatique endogène libère les analogues nucléosides originaux qui vont exercer leur action (Squires et al. 2001).

IV-1.3 Les Limitations des NRTIs

L'utilisation thérapeutique des NRTIs est limitée par plusieurs facteurs (Cihlar et al. 2010). Premièrement, l'émergence rapide des souches résistantes aux NRTIs, qui est encore la principale limitation en raison de traitement tout au long de la vie des patients. En particulier, il a été montré que près de 50% des patients ayant une charge virale assez élevée portent la souche mutante M184V et que 6-16% des patients ont été infectés par des virus résistants à au moins un médicament et, par conséquent, ont une moins bonne réponse aux thérapies. Ces patients ont une faible barrière pour sélectionner plus de souches résistantes aux médicaments (Cihlar et al. 2010; Johnson et al. 2008). Deuxièmement, l'interaction médicament-médicament entre les NRTIs utilisés en cocktail dans des traitements dont celle observée entre l'AZT et le D4T qui partagent la même voie de phosphorylation et qui ne présentent pas d'effet additif quand ils sont utilisés en combinaison (H. T. Ho et al. 1989), ou entre ddI et Tenofovir qui induisent une augmentation de la toxicité du médicament simple (Cihlar et al. 2010). Troisièmement les interactions médicament-médicament avec d'autres molécules dont celles observées dans le cas de l'ABC ou du Tenofovir lorsqu'ils sont administrés avec certains inhibiteurs de protéases (Cihlar et al. 2010; Waters et al. 2007), ou lorsque l'ABC est

administré avec l'éthanol (Mcdowell et al. 2000). Quatrièmement, plusieurs effets indésirables tels que la toxicité des mitochondries (induisant la myopathie, la myocardiopathie, l'anémie, la lipoatrophie), des réactions d'hypersensibilité aux médicaments, et des dysfonctionnements rénaux ont été associés aux traitements par les NRTIs (Cihlar et al. 2010). Compte tenu de ces effets indésirables, les nouveaux NRTIs qui sont actuellement à l'étude sont choisis dans l'optique d'un profil défavorable à la sélection des souches résistantes, ayant peu d'effets secondaires et / ou présentant un mécanisme d'action innovant.

IV-1.4 Les NRTIs en développement

Comme les autres NRTIs ils agissent en tant que terminateurs de chaîne. Le (-)-2'-deoxy-3'-oxa-4'-thiocytidine (**Apricitabine ATC**) (Figure 16) est l'analogue énantiomère(-) de la deoxycytidine et présente un profil favorable à l'apparition de souches résistantes. Actuellement l'ATC a montré un potentiel de réduction des souches TAMs (mutations analogues de la thymidine) de l'ordre de 2, avec ou sans la mutation M184V ainsi que de la mutation K65R, alors qu'il a un potentiel de réduction de 10 sur la souche mutante Q151M (Bethell et al. 2005; Z.Gu et al. 2006; Cox et al. 2009). ATC a une tendance à un profil favorable de toxicité, mais n'affecte que de façon mineure le niveau d'ADN mitochondrial (de Baar et al. 2007), alors qu'elle présente une interaction « drogue-drogue » négative, notamment quand elle est administrée avec la 3TC ou la FTC (Bethell et al. 2007). Globalement, l'ATC est en phase III d'essai clinique et semble être un bon candidat pour les patients en test des nouveaux NRTIs, y compris les personnes qui ont connu un échec virologique sous 3TC et le FTC ou porteurs de souches virales mutantes M184V. En effet, l'ATC a réussi le critère d'évaluation primaire d'un essai clinique de phase IIb chez les patients VIH avec la mutation M184V résistants aux médicaments.

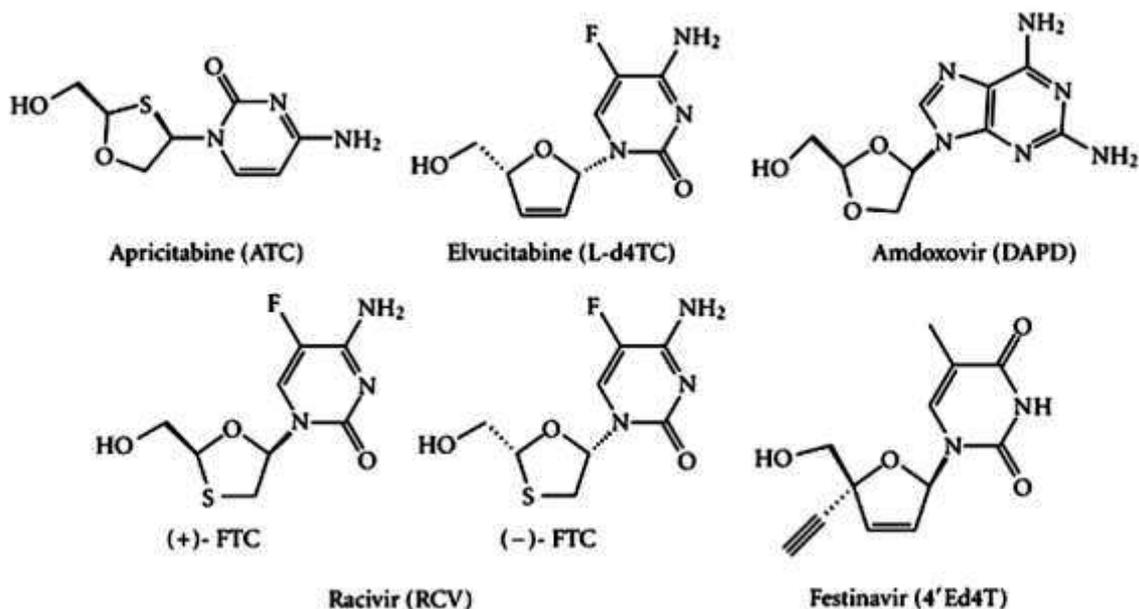


Figure 16 : Structure chimique des NRTIs en développement

La L- β -2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-5-fluorocytidine (**Elvucitabine, L-d4TC**) (Figure 16) est un analogue de la L-cytidine en essai clinique de phase II, qui a montré un potentiel nettement supérieur à celui de 3TC et qui ne présente aucune toxicité mitochondriale (Lin et al. 1996), mais au contraire elle a un effet remarquable protecteur contre la toxicité qui aurait été induite par la présence des autres NRTIs (Dutschman et al. 1998). Le profil de résistance dû à l'utilisation du Ld4TC est une sélection de mutation M14V de la RT. Cependant, il est 10 fois plus efficace sur le mutant résistant K65R par rapport à la souche sauvage (Parikh et al. 2005). Le 1- β -D-2,6-diaminopurine dioxolane (**Amdoxovir, DAPD**) (Figure 16) est une 'pro-drogue' en phase clinique II qui est à la base sous la forme de 1- β -D-dioxolone guanosine (**DXG**). Après phosphorylation il donne la drogue active. Le DAPD présente un profil favorable à la sélection des mutations de résistance notamment à celui de résistance (minimale) aux TAMs ainsi que la sélection des souches résistantes M184V (Z.Gu et al. 1999; Mewshaw et al. 2002). En outre, il montre un potentiel d'élimination des souches mutantes résistantes K65R et Q151M de 10 fois supérieur à la souche sauvage (Bazmi et al. 2000). Le DAPD affecte la quantité d'ADN mitochondrial alors que ce n'est pas le cas du DXG (Furman et al. 2001).

Le (\pm)- β -2,3-dideoxy-3-thia-5-fluorocytosine (**Racivir, RCV**) (Figure 16) est un mélange racémique de FTC (+) et (-), en étude clinique de phase II comme étant un composant d'une éventuel futur cocktail thérapeutique. Bien que ces 2 molécules inhibent RT (Feng et al. 1999), dans la cellule le FTC (-) est mieux phosphorylé que le FTC (+) (Shewach et al. 1993),

ce qui fait qu'il présente un potentiel antiviral supérieur (Schinazi et al. 1992). Le profil de résistance induit par le RCV est intéressant. En effet, le FTC(-) sélectionne les souches mutantes résistantes M184V, alors que le FTC(+) sélectionne le mutant résistant T215Y (Schinazi et al. 1997). Etant donné que la sélection simultanée de ces deux mutations d'acides aminés est incompatible, ce mélange racémique de mutations orthogonales conduit à un retard dans le début de l'apparition de résistance aux médicaments. A long terme, la toxicité mitochondriale doit cependant être encore pleinement réévaluée dans le cas de l'utilisation du RCV, d'autant plus que la discrimination du triphosphate FTC(+) par la RT est de 36 fois supérieure à celle de l'ADN polymérase γ des mitochondries (Feng et al. 2004). Enfin, les NRTIs terminateurs de chaîne tel que Festinavir (4'-Ed4T) (Yang G et al. 2008 ; Dutschman GE et al. 2004) sont actuellement en développement.

IV-2 Les Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la RT (NNRTIs)

Les NNRTIs sont des composés structurellement et chimiquement différents des NRTIs. Ils se lient de façon non compétitive à une poche hydrophobe de la RT, tout près du site actif de la polymérase (Figure 17), perturbant la structure de la protéine et inhibant ainsi l'étape chimique de la polymérisation (Mehellou et al. 2010; Das et al. 2006).

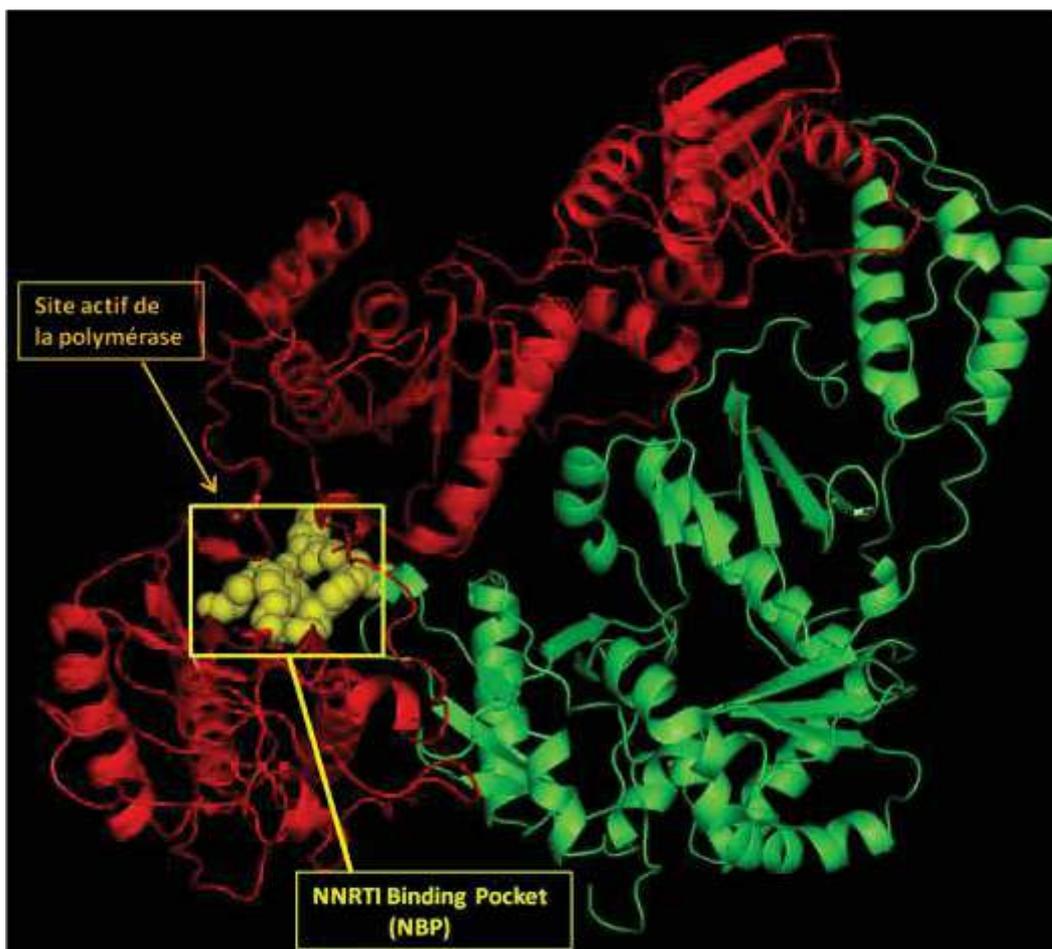


Figure 17 : Poche de fixation des NNRTI (NBP) à proximité du site catalytique de la Polymérase (voir zoom Figure 19) (les coordonnées de la structure cristallographique utilisée proviennent de RCSB Protein Data Bank code 1HMV, 1RTJ et la figure est générée en utilisant le logiciel PyMol version 0.93 Delano WL Scientific)

En fait, la fixation des NNRTIs à la RT induit des changements conformationnels rotamères de certains résidus (Y181 et Y188) et rendent le domaine thumb plus rigide, bloquant ainsi la synthèse d'ADN. Il est à noter, qu'à la différence des NRTIs, les NNRTIs n'ont pas besoin du métabolisme cellulaire pour exercer leur activité. A ce jour, plus de 30 composés différents pourraient être considérés comme étant des NNRTIs (Mehellou et al. 2010). Les NNRTIs actuellement approuvés par la FDA en clinique sont :

11-cyclopropyl-4-méthyl-5H-dipyrido[3,2b:2',3'-e] [1, 4] diazépín-6(11H)-one (**Nevirapine**), (S)-6-chloro-4-(cyclopropylethynyl)-4 (trifluorométhyl)-1H-benzo[d][1, 3]oxazin-2(4H)-one (**Efavirenz**), N-(2-(4-(3-(isopropylamino)pyridin-2-yl) piperazine-1-carbonyl)indolin-5-yl)methanesulfonamide (**Delavirdine**) et 4-((6-amino-5-bromo-2-((4-cyanophenyl)amino)pyrimidine-4-yl)oxy)-3,5-diméthylbenzonitrile (**Etravirine**) and 4-((4-

((4-(cyanomethyl)-2,6dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)amino)benzonitrile (**Rilpivirine**) (Figure18).

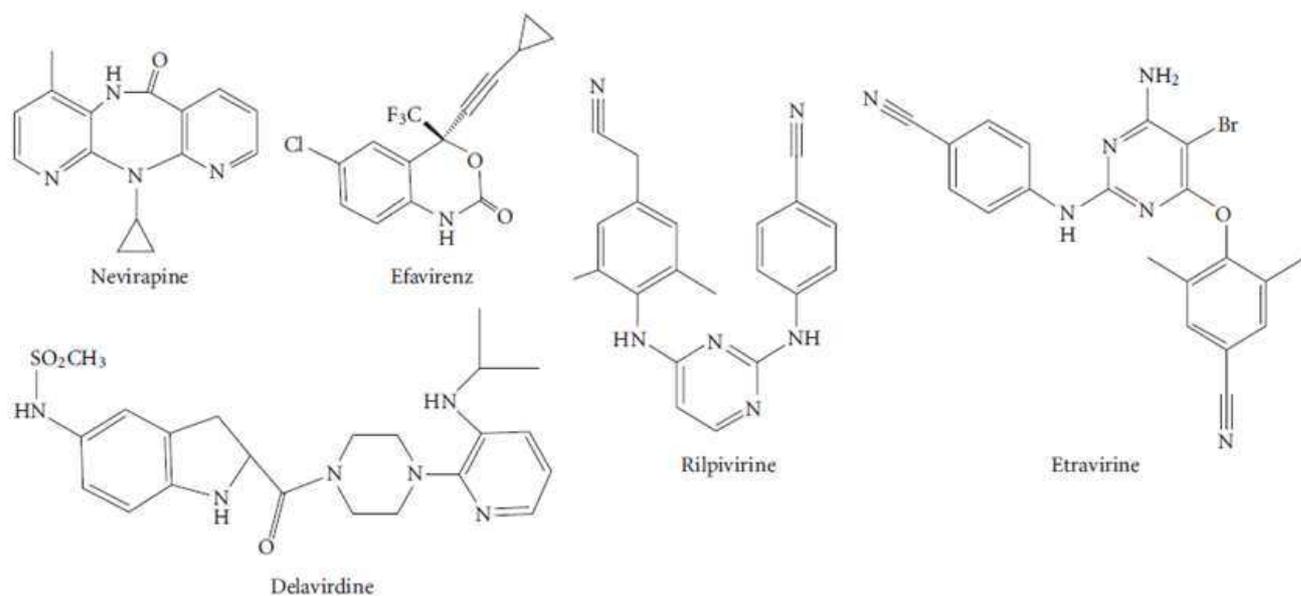


Figure 18 : Structure chimique des NNRTIs actuellement appliqués en clinique

IV-2.1 Les NNRTIs actuellement appliqués en clinique

Les études par cristallographie, et de modélisation moléculaire par "docking" ont révélé que cette première génération de NNRTIs présente une conformation étalée en forme de "papillon ouvert" (Mui et al. 1992; Schäfer et al. 1993; Ding et al. 1995; Mager et al. 2003; Sluis-Cremer et al. 2004). La stabilisation de la liaison des NNRTIs dans le site allostérique est accomplie à travers : (i) l'accumulation des interactions entre les cycles aromatiques des NNRTIS et les chaînes latérales des résidus Y181, Y188, W229, et Y318 dans la poche lipophile de RT; (ii) Les interactions Van der Waals avec les résidus L100, V106, V179, Y181, G190, W229, L234 et Y318; (iii) Des liaisons hydrogène entre NNRTIs et la chaîne principale des liaisons peptidiques (carbonyl / amino) de la RT (Mui et al. 1992; Schäfer et al. 1993; Ding et al. 1995; De Clercq et al. 1999; Balzarini et al., 2004). Une large partie de cette première génération, telle que la Delavirdine, s'étend vers la boucle flexible contenant le résidu P236, tout en maintenant des fortes interactions avec les résidus tyrosine 181 et 188, et les liaisons hydrogènes avec K103 (Esnouf et al. 1997). Ces interactions sont moins

importantes dans le cas de la fixation d'Efavirenz, alors que les liaisons hydrogènes entre l'inhibiteur et les points de contact de la protéine, notamment les résidus K101 et K103, sont cruciales (Ren et al. 2008). La première génération des NNRTIs, comme la Nevirapine et la Delavirdine sélectionne facilement des mutants résistants ne contenant qu'une simple mutation tels que Y181C, K103N, et Y188C (Mellors et al. 1992; 1993), qui altèrent leurs interactions hydrophobes, clés dans la fixation des NNRTIs au site de liaison. La seconde génération des NNRTIs, comme Efavirenz et Dapivirine, nécessitent habituellement deux ou plus de mutations dans la RT-VIH-1 avant de voir diminuer significativement leur potentiel antiviral. En général, deux ou plusieurs mutations de RT-VIH-1 sont regroupées dans la poche des NNRTIs, suggérant un mode conformationnel direct de réduction de fixation de NNRTIs, même si d'autres mécanismes peuvent également être présents tels que celui démontré par la mutation V108I qui induit une résistance en perturbant les résidus Y181 et Y188 (Ren et al. 2008) ou le mécanisme proposé pour la mutation K103N qui devrait stabiliser la conformation de la RT

et, par conséquent, créer une barrière d'énergie contre la fixation des NNRTIs, ce qui réduit leur efficacité (Ren et al. 2008). D'une manière importante, les souches virales NRTI-résistantes gardent une sensibilité totale aux effets inhibiteurs des NNRTIs, et vice versa. Cependant, il a été récemment démontré que, des mutations dans les domaines de connexion et de RNase H telles que N384I, T369I et E399D confèrent une résistance à la fois aux NRTIs et aux NNRTIs, probablement en altérant le positionnement de l'amorce/matrice (Yap et al. 2007; Hachiya et al. 2008; Nikolenko et al. 2010).

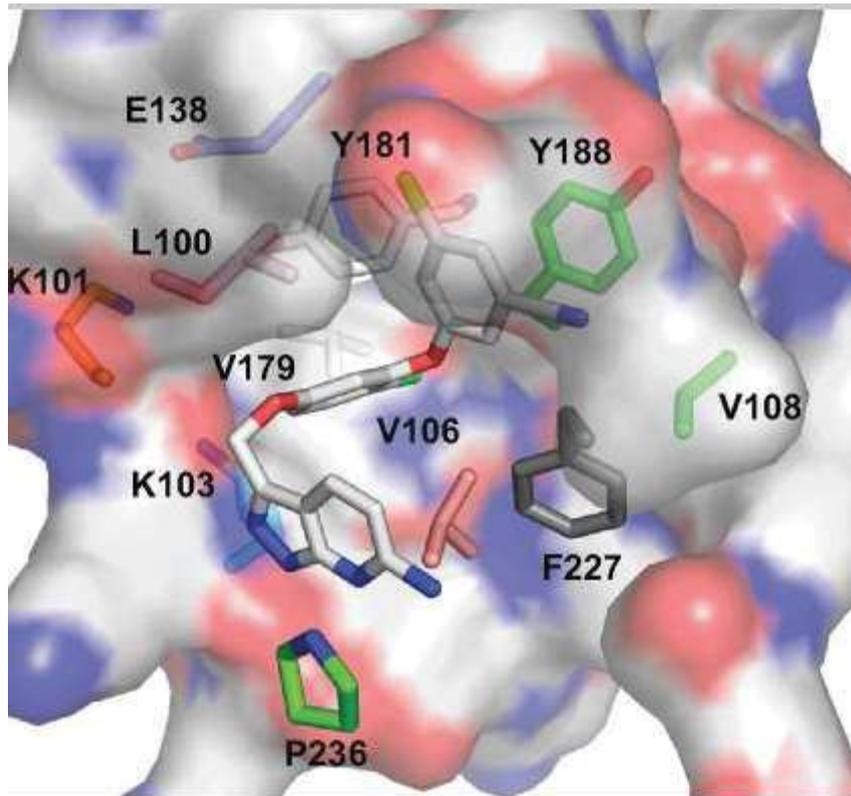


Figure 19 : Zoom sur la poche de fixation des NNRTIs

Mise en évidence des résidus impliqués dans la fixation des NNRTIs sur la RT (basée sur la structure cristallographique de RT/MK-4965 : Lai, M.T et al. 2010)

IV-2.2 les nouveaux NNRTIs

L'utilisation thérapeutique des NNRTIs est limitée principalement par la sélection des virus NNRT-résistants, même si l'hypersensibilité aux médicaments et/ou de graves dysfonctionnements du système nerveux central sont les conséquences d'une toxicité à certains NNRTIs. Pour cette raison, il y a une focalisation active sur le développement des nouveaux NNRTIs qui doivent être actifs spécialement sur les souches mutantes résistantes K103N, Y181C et Y188V. Outre le fait que plus de 30 classes d'inhibiteurs conformationnels (NNRTIs) ont été rapportées à ce jour (Sluis-Cremer et al. 2008; Zhan et al. 2009), le développement de nouveaux NNRTIs s'est porté sur l'identification de molécules préservant une haute flexibilité de conformation et une adaptabilité positionnelle, dans le but d'ajuster la conformation de l'inhibiteur à la poche du site de liaison des NNRTIs dont la forme est différente selon la présence des différents acides aminés impliqués dans la résistance aux NNRTIs. En effet, alors que les NNRTIs de première génération, comme la Nevirapine, la

Delavirdine, ou l'Efavirenz, se lie à RT dans une conformation en forme de "deux ailes déployées" (ou "en forme de papillon"), les NNRTIs les plus récemment développés montrent une conformation plus souple en forme de "U" (ou "fer à cheval") qui donne une plasticité croissante à ces dérivés (K. Das et al. 2005 ; P.Zhan et al.2009). Les succès d'une telle approche a permis de proposer des récents NNRTIs approuvés en clinique tels que l'Etravirine et la Rilpivirine (Figure 18), ainsi qu'un autre composé, le Dapivirine actuellement en phase clinique I/II (Das et al. 2005; Zhan et al. 2009).

Une autre stratégie complémentaire utilisée pour améliorer la performance des NNRTIs est de développer des produits dérivés qui interagissent fortement avec les acides aminés hautement conservés dans la poche de liaison des NNRTIs, tels que F227, W229, L234 et Y318 (Zhan et al. 2009; Janssen et al. 2005). En effet, ces trois premiers résidus font partie du 'Primer grip' et maintiennent l'amorce en ses extrémités dans une orientation appropriée pour une attaque nucléophile sur le dNTP entrant. Plus précisément, le résidu W229 est le candidat de choix pour la conception de médicaments, et il a été entre autres, rapporté que la Rilpivirine mentionnée ci-dessus établit de fortes interactions avec le cycle indole du W229 (Zhan et al. 2009).

Un autre NNRTI intéressant qui a été rapporté, le 3-(4-(2-méthyl- 1H-imidazo[4,5-c] pyridin-1-yl)benzyl)benzo[d]thiazol-2(3H)-one (**CP94707**) (Figure 20) inhibe la RT^{wt} et les mutants Y181C et Y188C et présente une efficacité d'inhibition réduite d'un facteur 2 dans le cas du mutant K103N (Pata et al. 2004). L'acide aminé Y115 peut agir dans le contrôle de l'accès au site catalytique, discriminant les désoxynucléotides des ribonucléotides. Par conséquent, il a été proposé que CP94707 peut avoir un mode d'action non conventionnel (Ren et al. 2005). Les séries des NNRTIs dérivés de N-hydroxyimide tels que le composé 1-((benzyloxy) méthyl)-6-(3,5-diméthylbenzoyl)-5-éthyl-3-hydroxydihydropyrimidine-2, 4 (1H, 3H)-dione (**HDIP**) (Figure 20) ont été développés pour être des doubles inhibiteurs de RT et de l'IN (DRT-INI). En effet, ces molécules peuvent inhiber à la fois la fonction RDDP associée à RT et l'activité de l'IN, et il a été proposé qu'elles se lient au site de fixation des NNRTIs tout en chélatant les ions magnésium du site actif de l'intégrase (Tang et al. 2011; Oberg et al. 1989).

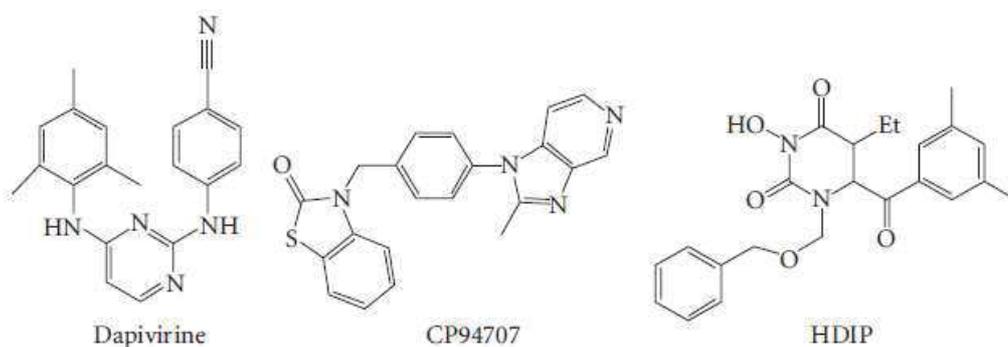


Figure 20 : Structure chimique des nouveaux NNRTIs

IV-2.3 Les inhibiteurs analogues des pyrophosphates PPI

Le Foscarnet (phosphonoformiate, PFA) (Figure 21) est un analogue de PPI qui cible l'ADN polymérase du virus de l'herpès ainsi que la RT des rétrovirus (Oberg et al.1989). Le Foscarnet est utilisé par voie intraveineuse pour traiter les infections opportunistes virales, notamment la rétinite à CMV chez les patients atteints du SIDA, mais son profil pharmacocinétique est compliqué par la néphrotoxicité (Razonable et al. 2011). Lorsqu'il est testé contre la RT-VIH-1, il bloque compétitivement la pyrophosphorolyse et la réaction de transfert de PPI, suggérant que Foscarnet et PPI partagent des sites de fixation qui se chevauchent (Derse et al. 1982). Il a été démontré que le Foscarnet se fixe au complexe de pré-translocation de RT empêchant la fixation du prochain nucléotide, c'est pourquoi ce complexe de pré-translocation a été proposé comme cible de nouvelles stratégies thérapeutiques (Marchand et al. 2007). Il a été mis en évidence, *in vivo* et *in vitro*, que les mutants résistants à Foscarnet sont porteurs d'une multitude de mutations dans le gène de la RT incluant W88G / S, E89K / G, L92I, A114S, S156A, Q161L et H208Y (Mellors et al. 1995; Tachedjian et al. 1995; G.J.Im et al. 1993; Tramontano et al. 1998). Notamment, la plupart des mutations qui réduisent la susceptibilité au Foscarnet, confèrent une hypersensibilité à l'AZT. Par ailleurs, il a été suggéré que les analogues de Foscarnet peuvent inhiber la voie phosphorolytique de délétion des NRTIs fixés à la terminaison des amorces et peuvent être utilisés pour empêcher le mode d'excision de base qui confère la résistance aux NRTIs (Cruchaga et al. 2006).

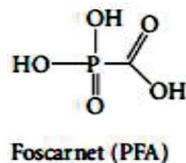


Figure 21 : Exemple d'analogue des PPI(Foscarnet)

IV-3 Les inhibiteurs de la RNase H

En dépit du fait que la fonction RNase H associée à la RT est essentielle pour le processus de transcription inverse et ceci au même titre que la fonction d'ADN polymérase, aucun inhibiteur de RNase-H (RHRTIs) n'est arrivé au stade d'essai clinique pour le moment. Cependant, au cours de ces dernières années, une petite classe de RHRTIs qui ciblent spécifiquement le site actif de la RNase-H a été identifiée (G.J.Im et al. 1993; Tramontano et al. 2006). La plupart sont capables de chélater l'ion magnésium divalent qui est dans le site actif de la RNase-H. Cependant, ils exercent aussi une haute toxicité cellulaire, probablement due d'une part à une chélation métallique non spécifique. Une autre raison du difficile développement de ces molécules est que le site actif du domaine de RNase-H est une poche ouverte qui n'offre du moins jusqu'à présent que peu d'éléments pour une optimisation de petites molécules sélectives.

IV-4 Les doubles inhibiteurs de RNase H et de l'IN

Le premier RHRTI récemment découvert est l'acide diketo (**DKA**). Ses dérivés tels que le 4-[5-(benzoylamino)thien-2-yl]-2,4-acide dioxobutanoïque (**BTDBA**) (Shaw-Reid et al. 2003) et le 6-[1-(4-fluorophenyl)méthyl-1Hpyrrol-2-yl]-2,4-dioxo-5-acide hexenoïque ethyl ester (**RDS-1643**) (Figure 22) (Tramontano et al. 2005), ont été élaborés pour agir indépendamment contre l'IN du VIH-1. En raison des similitudes entre les sites actifs de la RNase H et de l'IN, ils sont testés en tant que RHRTIs et se sont avérés actifs. Tous les deux sont capables de chélater l'ion Mg^{2+} dans le site catalytique de la RNase H et sont inactifs sur la fonction d'ADN polymérase (Shaw-Reid et al. 2003; Tramontano et al. 2005). C'est pourquoi les DKAs sont actuellement en développement comme doubles inhibiteurs de RNase

H et d'IN (DRH-NI) (Tramontano et al. 2010 ; Di Santo et al.2003 ; Costi et al. 2004a ; 2004b).

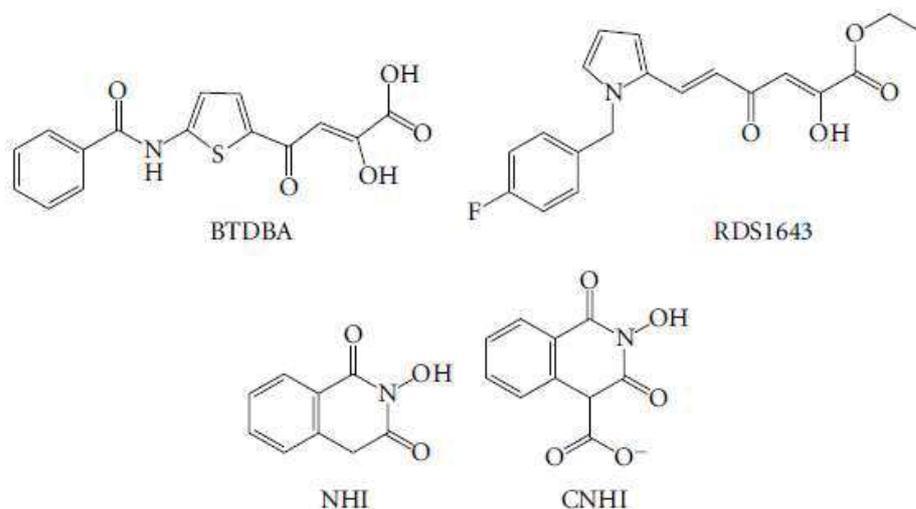


Figure 22 : Structure chimique des inhibiteurs à la fois de RNase H et de l'Intégrase RHRTI-IN

Les autres dérivés qui ont également été développés comme DRHI-NIs sont des N-hydroxyimides. Le 2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones (**NHI**), prototype de ces inhibiteurs (Figure 22) (Klumpp et al. 2003; Hang et al. 2004; Billamboz & Cotellet et al. 2008), a été démontré par des structures cristallographiques avec le domaine RNase H isolé, qu'il se lie strictement à la RT dans la conformation dépendante de l'ion métallique Mg^{2+} , confirmant son mode d'action lié à l'ion métallique. Plus récemment, d'autres dérivés de N-hydroxyimide ont été synthétisés comme DRH-INIs (Billamboz et al. 2008; 2011). L'un de plus intéressant est le methyl 2-Hydroxy-1,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-4-carboxylate analogue (**CNHI**) (Figure 22). Il est capable d'inhiber le double mutant G140S/Q148H, l'une des souches les plus résistantes au Raltégravir (inhibiteurs d'intégrase : INI) (Billamboz et al. 2011). Ceci indique qu'il est possible de concevoir des composés avec le même mode d'action qui peuvent (i) inhiber à la fois la RNase H et l'IN (ii) inhiber spécifiquement l'une des deux enzymes. Des études par modélisation moléculaire ont montré que ces composés se lient à une poche hydrophobe comprenant les résidus V276, C280, K281, K275, R277, et R284 du domaine thumb de p51 et les résidus G541 et H539 du domaine de RNase H (Chung et al. 2010). Une autre classe de double inhibiteurs contient des produits naturels tels que l'hydroxytropolone β -thujaplicinol et le manitol. Ils sont à la base développés pour inhiber l'IN-VIH1 par le mode d'inhibition métal-dépendant et par la suite,

ils ont montré une bonne activité inhibitrice de la RNase H (Chung S et al ; 2011 ; Le Grice et al.2012).

IV-5 Les doubles inhibiteurs de la RNase H et de la polymérase

Une classe intéressante de RHRTIs comprend les dérivés d'hydrazone, dont le premier analogue décrit est le N-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde hydrazone (**BBNH**) (Figure 23). Contrairement aux autres NNRTIs ou RHRTIs, le BBNH inhibe à la fois les 2 activités Polymérase et RNase H de la RT-VIH-1 (Borkow et al. 1997), et peut donc être considéré comme un double NNRTI (DNNRTI). BBNH inhibe les activités de la RT associées à la RNase H et au RDDP (« RT-associated RNA dependent DNA polymerase activities ») des mutants K103N, Y181I, Y188H et Y188L avec un potentiel similaire à RT^{wt}. En revanche, lorsqu'il est testé sur le mutant Y181C, il inhibe uniquement la fonction RDDP et est complètement inactif sur la fonction RNase H (Arion et al. 2002). Cette information, conjuguée à d'autres données sur d'autres dérivés d'hydrazone qui chélatent le cofacteur d'ion métallique dans le site de la RNase H (Sluis-Cremer 2002), permet de proposer que deux molécules de BBNH peuvent en même temps interagir avec RT sur deux sites différents, la première dans le domaine de polymérase, éventuellement à proximité du site de liaison des NNRTI, et la seconde dans le domaine de RNase H. Par la suite, un autre dérivé, le (E)-3,4-dihydroxy-N-((2-hydroxynaphthalen-1-yl) méthylène) benzohydrazide (**DHBNH**) (Figure 23), s'est montré capable de se fixer à proximité du site actif de la polymérase dans une poche différente de celle de fixation des NNRTI et aussi à une distance > 50 Å du site actif de la RNase H (Himmel et al. 2006). Plus récemment, des études de « docking » moléculaire sur une série d'analogues d'hydrazone, ont montré qu'ils se lient à une poche qui comprend les résidus Y405, W406, Q500, et Y501 de la sous-unité p66, et par conséquent, qu'ils forment des interactions hydrophobes avec RT et avec des paires de bases dans le sillon du substrat ARN/ADN (Felts et al. 2011). En fait, les résidus D499 et A502, qui sont adjacents à Q500, et qui sont perturbés par la présence des dérivés hydrazone (Felts et al. 2011), font partie des points d'interaction de l'amorce au domaine RNase H et ils jouent un rôle dans l'alignement du substrat ADN/ARN avec le site actif. Par conséquent, la fixation des hydrazones à Q500, peut perturber le processus de l'adhérence à l'amorce dans l'activité RNase H. De façon concrète, une étude de cristallographie au rayon x a montré que le dihydroxy benzoyl naphthyl hydrazone ((E)-3,4-dihydroxy-N'-((2-methoxynaphthalen-1-yl)méthylène)

benzohydrazide) se fixe à environ 50 Å du site actif RNase H en interagissant avec T229 du primer grip et D186 du site actif de l'ADN polymérase (Himmel et al. 2006 ; Le Grice et al 2012).

La seconde classe des DNNRTIs est une série d'emodine (Tatyana et al. 2009) et d'alizarine dérivées d'antraquinone (Francesca et al. 2011; Tramontano et al. 2011), tels que le 1-acetoxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl 4-bromobenzoate (**KNA-53**) (Figure 23), ils inhibent toutes les fonctions de RT aussi bien sur le sauvage que le mutant K103N. En outre, ils inhibent uniquement la fonction RNase H du mutant Y181C. Les études du mode d'action et la simulation de la dynamique moléculaire conduisent à proposer que les dérivés d'antraquinone se lient à un site adjacent à la poche des NNRTIs qui a été à l'origine décrit (Himmel et al. 2006) dans le cas des dérivés hydrazones (Esposito et al. 2012). En conséquence, il a été suggéré que l'inhibition de la fonction RNase H par l'antraquinone pourrait être due à un changement de la disposition de l'hybride ARN/ADN par rapport à la RT, induit par la liaison à cet anthraquinone, qui entraîne une possible variation de trajectoire d'acide nucléique vers le site catalytique de la RNase H (Esposito et al. 2012).

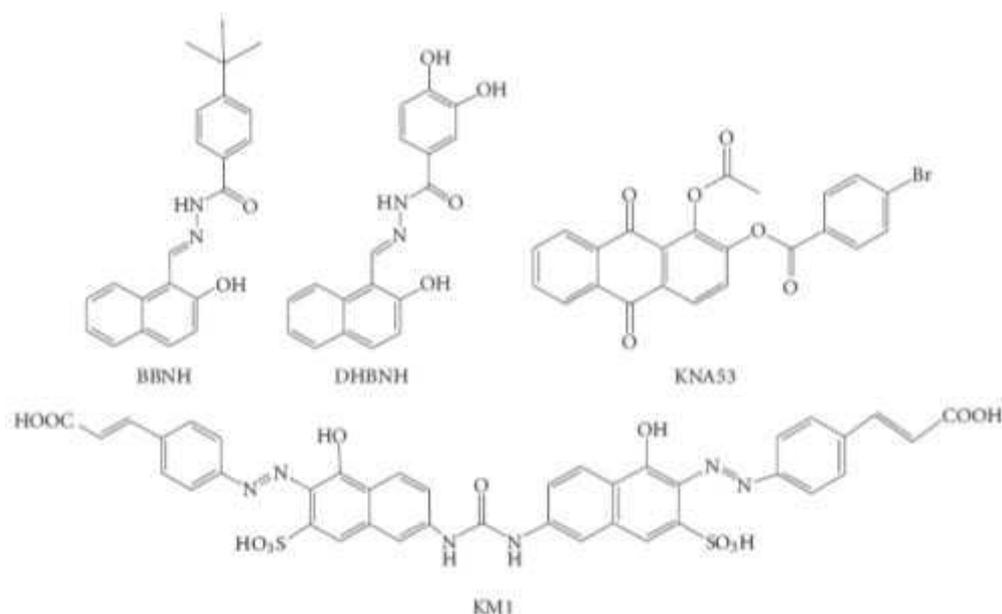


Figure 23 : Structure chimique des doubles inhibiteurs de la RNase H et de la polymérase

La troisième classe des DNNRTIs sont des dérivés d'acide naphthalenesulfonique qui ont été initialement décrits pour avoir une activité sélective sur la fonction RDDP associée à la RT (P.Moha et al. 1994). Ils sont élaborés et développés sur la base de la structure, de similarité moléculaire et de la chimie médicinale combinatoire, pour obtenir les composés acide 2-

Naphthalenesulfonique (4-hydroxy-7-[[[[5-hydroxy-6-[(4-cinnamylphenyl)azo]-7-sulfo-2-naphthalenyl]amino]-carbonyl]amino]-3-[(4-cinnamylphenyl)azo] (**KM-1**) (Figure 23), qui inhibent les deux fonctions de la RT (Skillman et al.2002). Par la suite, il a été démontré que le KM-1 affaiblit l'affinité de la liaison RT/ADN et donc dissocie l'ADN de l'enzyme (Wang et al.2004). Par conséquent, il a été proposé qu'il empêche le bon alignement de l'ADN dans le site actif de la polymérase, réduisant ainsi la formation du complexe ADN lié à la RT requis pour l'incorporation des nucléotides (Wang et al.2004). Il est important de noter que des questions ont été soulevées en ce qui concerne l'utilisation de combinaisons entre RHRTIs et les NRTIs. En effet, il a été proposé que l'utilisation des RHRTIs aboutit à une augmentation de résistance aux NRTIs en imitant le mécanisme d'inhibition de l'activité RNase H (Yap et al. 2007 ; Le Grice et al 2012). Cependant, des études récentes sur les effets de certains RHRTIs sur la susceptibilité du VIH-1 à l'AZT et au 3TC ont montré qu'aucun des RHRTIs testés n'induit la diminution de la sensibilité aux NRTIs, alors que seulement un DNNRTI diminue la sensibilité à l'AZT de 5 fois (Davis et al.2011). D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre l'interaction entre l'inhibition de la RNase H et la susceptibilité aux NRTIs, ainsi que sa pertinence clinique.

IV-6 Les inhibiteurs de la dimérisation de la RT

IV-6.1 Mécanisme moléculaire de la dimérisation de la RT

La forme biologique active de la RT est un hétéro-dimère asymétrique, et bien que chacune de ses deux sous-unités comporte le domaine catalytique de l'activité polymérase sous forme monomérique, individuellement elles sont inactives pour la catalyse (di Marzo et al.1986; Restle et al.1990 ; Seckler et al.2009). Les deux sous-unités forment un hétéro-dimère hautement stable sur le plan thermodynamique, avec une énergie libre de Gibbs d'interaction du dimère de 10-12 kcal/mol, et une constante de dissociation du picomolaire. Cette interaction est de plus stabilisée par la présence du duplex amorce/matrice (ADN/ADN) (Rittinger, et al.1995; Barkley et al. 2005 ; 2007).

La forme hétéro-dimérique p66/p51 est la seule forme de RT présente dans les virus, les homo-dimères sont seulement mis en évidence *in vitro* et sont moins stables avec des constantes de dissociation de 10 à 100 fois inférieures (p66/p51 (pM) > p66/p66 (µM) >

p51/p51 (mM)) (Restle et al.1990 ; Divita et al. 1995b ; Reckler et al.2009). La formation de la RT hétéro-dimérique native a été caractérisée en détail en combinant des approches structurales, dynamiques et fonctionnelles. Il a été démontré que la formation du dimer de RT est un processus en deux étapes (Figure 24) (Divita et al. 1995a ;1995b). La première étape est une rapide association concentration-dépendante des deux sous-unités principalement médiée par des contacts entre les domaines de connexion des 2 sous-unités et impliquant le motif riche en tryptophanes. Cette première étape permet la formation d'un intermédiaire hétérodimérique inactif. Cette étape d'association de 2 sous-unités "la dimérisation" est favorisée par la présence de l'amorce/matrice et du magnésium ou de manganèse (Goody et al. 1993). La seconde étape dite "maturation" est une isomérisation lente de l'intermédiaire vers une forme hétérodimérique active de la RT. Ce changement de conformation implique l'interaction du domaine 'thumb' de p51 avec le domaine RNase H de p66 en particulier entre les motifs de résidus (280-290) et de résidus (537-546) respectivement et un réarrangement du contact entre le domaine fingers (P52-P55 et S135-P140) de p51 et le domaine palm de p66 (D86-L92), stabilisant le site catalytique de la polymérase. Lors de la maturation du virus, le scénario de dimérisation de la RT est probablement plus complexe et implique une multimérisation directe de la polyprotéine Gag-Pol (Lio et al. 2004 ; Zybarth et al.1995 ; Cherry et al.1998). Il a été postulé qu'en raison de sa taille et de sa tendance à dimériser, la RT joue un rôle important dans la dimérisation de Gag-Pol favorisant l'activation de la PR. Le mécanisme de dimérisation de Gag-Pol initié par le C-terminal du domaine RNase H passe par une association homodimérique p66/p66 et ensuite son clivage par la PR (Figueiredo et al. 2006 ; Sluis-Cremer et al. 2004 ; Hornak et al. 2007).

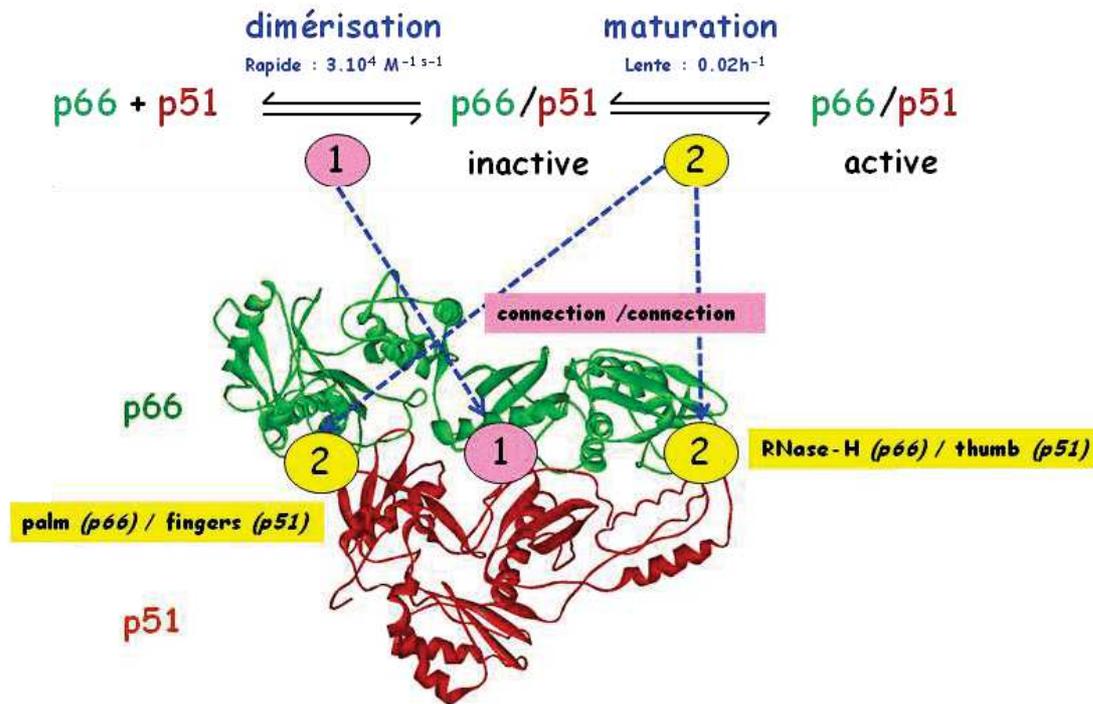


Figure 24 Mécanisme de dimérisation de la RT : *Etape 1, rapide association de p66 en vert et p51 en rouge. Etape2, maturation lente de la RT aux points d'interactions palm (p66)/fingers (p51) et RNase H (p66)/thumb (p51) (Divita et al. 1995).*

IV-6.2 Les inhibiteur de la dimérisation de la RT (DimRTIs)

La dimérisation de la RT est une nécessité absolue pour toute activité enzymatique, et, par conséquent, le développement des inhibiteurs ciblant la dimérisation de RT représente une stratégie antivirale alternative prometteuse (Srivastava et al.2006).

IV-6.2.1 Les petites molécules

Jusqu'à maintenant, seule une série de petites molécules se sont révélées capables d'inhiber la dimérisation de RT. Parmi elles, le dérivé de BBNH (Borkow et al.1997 ; Sluis-Cremer et al.2002) et le dérivé de [2',5'-bis-O-(tertbutyldimethylsilyl)-beta-D-ribofuranose]-3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide) (TSAO) (Figure 25) (Camarasa et al.2006), forment de nombreux contacts avec la boucle $\beta 7/\beta 8$ de la sous-unité p51, qui forme le "plancher" de la poche de liaison des NNRTIs et se structure en forme de sillon comme le site de fixation de l'amorce/matrice sur la sous-unité p66. Une autre étude a permis d'identifier des composés 7-

hydroxy-9-(4-hydroxy-phényl) -1,3 - diméthyl-1, 6,7,8,9,10 et un hexahydropyrimido-[2,1-f] purine-2,4 (3H, 4aH)-dione, les MASOs inhibiteurs très actifs de la dimérisation de RT (DimRTIs) (Figure 25) (Grohmann et al.2008).

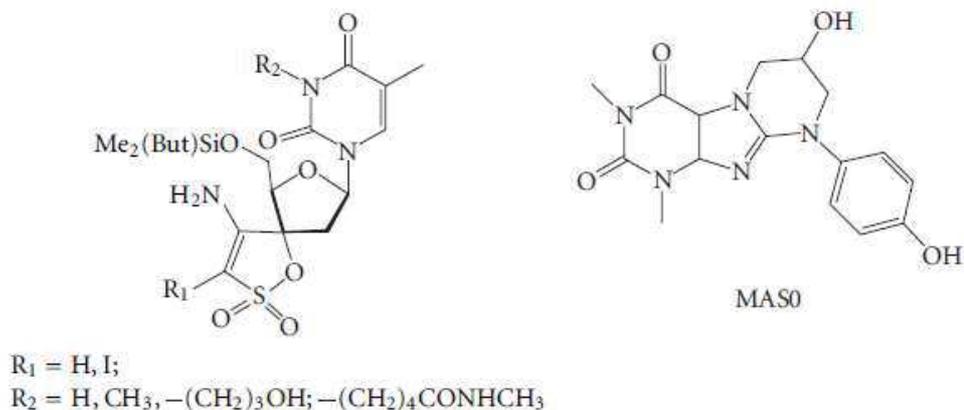


Figure 25 : Structure chimique des inhibiteurs de la DimRTIs

Les NNRTIs classiques tels que l'EFV ou la NVP, peuvent être rangés dans la classe de DimRTIs. En effet, il a été montré que ces molécules augmentent considérablement l'association des sous-unités p51 et p66, et donc favorisent la dimérisation de RT aussi bien *in vitro* et *in vivo* (Tachedjian et al.2001; 2003; Suis-cremer et al.2004; Figueiredo et al.2006). Ces NNRTI induisent un accroissement rapide de la dimérisation de RT contribuant à une partie de leur activité d'inhibition et bloquent par la suite la RT dans une conformation non processive. Cependant, le mécanisme selon lequel s'effectue cette amélioration de dimérisation de RT par certains NNRTIs, n'est pas clairement défini. L'EFV est capable de se lier de façon similaire aux deux monomères p51 et p66 en favorisant aussi bien la dimérisation des homodimères que de l'hétérodimère (Sekler et al.2009; Venezia et al.2006).

IV-6.2.2 Les inhibiteurs peptidiques de la RT

Si à l'heure actuelle, il n'existe aucun inhibiteur peptidique de la RT en clinique, une première expérience clinique a été réalisée dans l'utilisation de peptide inhibiteur pour bloquer l'entrée du virus dans la cellule cible : Le Fuzeon ou T20 (Rimsky et al. 1998). Un des avantages des peptides réside dans leurs propriétés à être facilement modulables en comparaison aux petites molécules, ce qui fait d'eux des molécules prometteuses pour de nouvelles alternatives qui

seraient efficaces contre les mutations de résistances aux traitements actuels. Des peptiques capables de cibler les deux étapes de l'activation de la RT (l'étape de la dimérisation" et l'étape de la "maturation") et de bloquer efficacement la réplication virale ont été élaborés (Depollier et al.2005 Agopian et al.2009) (Développé en détail dans les chapitres suivants).

OJECTIFS

Actuellement, plus de 34 millions de personnes à travers le monde vivent avec le VIH et environ 25 millions en sont décédées depuis 1983. Le nombre de nouveaux cas par an s'élève aux alentours de 2 millions. Même si les thérapies actuelles (HAART) ont permis de prolonger considérablement la vie des patients, elles engendrent de nombreux effets secondaires et à l'heure actuelle il n'existe aucun traitement curatif contre le SIDA.

Le processus de reverse transcription est une étape clé et indispensable au développement du virus. En conséquent, la RT représente la cible majeure des antirétroviraux actuellement utilisés en clinique. Les NRTIs et NNRTIs ont permis de réduire considérablement la charge virale des séropositifs, néanmoins leurs applications restent encore limitées par l'émergence rapide de résistance contre ces inhibiteurs et par d'énormes effets secondaires tels que la toxicité mitochondriale liée aux NRTIs. C'est pourquoi, il est urgent de proposer des nouvelles molécules qui seront plus spécifiques et donc moins toxiques afin d'améliorer le confort des malades, mais qui seront également actives et efficaces sur les mutants résistants aux médicaments.

Deux étapes clés sont nécessaires à l'obtention de la forme active de la RT : la "dimérisation" qui consiste en "l'association" des deux sous-unités suivie de la "maturation" s'effectuant via des changements conformationnels fins à l'interface protéine/protéine impliquant les sous-domaines palm (p66) / fingers (p51) et RNase H (p66) / thumb (p51) (Divita et al. 1995b). Les équipes du Dr R. Goody (MPI Dortmund) et du Dr G. Divita (CRBM-Montpellier) ont proposé que la dimérisation de RT constituait une cible potentielle pour le développement d'une nouvelle génération d'inhibiteurs (Divita et al. 1995a). Une stratégie ciblant les interfaces protéine/protéine impliquées dans la dimérisation a été élaborée et des peptides agissant sur une des deux étapes d'activation ont été proposés comme inhibiteurs de la formation de RT active.

I Les peptides inhibiteurs de la dimérisation de RT

La connaissance approfondie de la structure de la RT a permis d'identifier l'interface entre les deux sous-unités et d'élaborer des petits peptides de 15 à 19 résidus capables d'interférer avec le processus de dimérisation et donc de bloquer les activités enzymatiques. Ces peptides dérivent directement d'un motif riche en tryptophanes hautement conservé au niveau des points "hot spot" sur le sous-domaine de connexion de la RT (Morris et al. 1999). Il a été démontré que ce "cluster" de tryptophanes est essentiel à la dimérisation de l'enzyme

(Tachedjian et al. 2000; 2003; Divita et al. 1995a ; 1995b). Les peptides issus de la séquence 389-407 : FKLPIQKETWETWWTEYWE et contenant les 4 premiers résidus tryptophanes W³⁹⁸, W⁴⁰¹, W⁴⁰², W⁴⁰⁶ du cluster sont capables de s'associer aussi bien à la sous-unité p66 qu'à la p51 avec des constantes de dissociation de l'ordre du micro-molaire et réduisent efficacement la dimérisation. L'optimisation de cette séquence a permis de proposer le peptide Pep7, un court peptide de 10 résidus (KETWETWWTE) qui se lie fortement à RT avec une constante de dissociation Kd de l'ordre du nanomolaire (100nM). Pep-7 empêche la dimérisation *in vitro* (Ki = 152 nM) et la réplication virale *in cellulo*, lorsqu'il est vectorisé avec un vecteur peptidique (EC₅₀ : 1,6 nM). Pep-7 ne présente aucune toxicité, avec un indice de sélectivité 10 fois supérieur à celui de l'AZT, l'anti-RT de référence utilisé en clinique (Morris et al.1999 ; Fisher et al.2003). L'étude mécanistique a démontré que Pep-7 est capable d'interférer avec la première étape de la formation de RT du VIH-1 en empêchant l'association des deux monomères. En fait, Pep-7 ne cible pas directement l'association des deux sous-unités, mais se lie préférentiellement à la sous-unité p51 au sein de la RT hétérodimerique au niveau des résidus W²⁴ et F⁶¹, induisant une déstabilisation du dimère, en particulier au niveau des contacts entre les sous-domaines fingers et connexion de la sous unité p51 maintenant la forme fermée de l'enzyme (Depollier et al. 2005).

II Les peptides inhibiteurs de la maturation de RT

L'étape de la maturation se traduit par des changements de conformation entre les domaines palm (p66) / fingers (p51) et RNase H (p66) / thumb (p51) (Divita et al.1995a,b ; Morris et al.1999). Ces changements conformationnels lors de la "maturation" de RT, constituent une autre cible potentielle pour l'inhibition de RT. Le ciblage de la maturation présente un fort avantage qui repose sur le fait, qu'il ne nécessite pas la dissociation complète des sous-unités pour l'inhibition. D'une manière générale, le sous-domaine thumb joue un rôle important dans la catalyse et l'intégrité structurale de la forme dimérique de RT : le domaine thumb de p66 est impliqué dans la liaison à l'amorce/matrice et l'activité de la polymérase de la RT (Kohlstaed et al.1992; Jacobo-Molina et al.1993 ; Huang et al.1998 ; Jaques et al.1994), alors que le domaine thumb de p51 est nécessaire pour les changements conformationnels associés à la maturation de la RT (Morris et al.1999) et stabilise le domaine RNase H jouant un rôle dans l'activité RNase H. Des peptides inhibiteurs de la maturation ont été élaborés après criblage d'un fragment comportant les résidus 285-300, très conservé du domaine thumb, correspondant à l'extrémité de l'hélice αI , la boucle $\alpha I / \alpha J$ et un bout de

l'hélice α J (Morris et al.1999 ; Agopian et al. 2009). Cette étude a permis d'identifier le peptide Paw (GTKWLTEWIPLTAEAE) comme un inhibiteur conformationnel de la RT-VIH-1 (Agopian et al.2009). L'étude du mécanisme d'action de Paw a démontré que ce peptide se lie préférentiellement à la forme dimérique non processive et inactive de RT tout en stabilisant l'enzyme. Paw présente une meilleure affinité pour la conformation ouverte, c'est-à-dire pour le complexe RT-amorce/matrice que pour la forme fermée de la RT et diminue l'affinité de RT pour l'amorce/matrice (Agopian et al. 2009).

Une nouvelle stratégie d'inhibition de RT a été décrite en démontrant que ces deux étapes peuvent être contrôlées et ciblées par des peptides courts mimant les interfaces protéine/protéine. Le développement d'inhibiteurs ciblant principalement ces deux étapes a donc constitué les deux axes principaux de mon travail de thèse.

III Objectifs

III-1 Identification et mécanisme d'action du peptide P_{ID4} : inhibiteur de l'étape de "dimérisation"

L'objectif de la première partie de mon travail de thèse a été l'étude du mécanisme moléculaire de Pep7 et son optimisation afin de proposer un nouveau peptide inhibiteur P_{ID4} . Afin de concevoir un meilleur peptide inhibiteur de cette étape, il nous était essentiel d'une part de déterminer le site de fixation du peptide Pep-7 et de caractériser un motif minimum d'inhibition. Dans ce but, une étude par modélisation moléculaire a permis d'identifier le site de fixation de Pep7 sur RT et de proposer des mutations dans ce site et sur Pep-7 afin de caractériser son mode d'action. Dans cette étude mécanistique, nous avons évalué la capacité de variants de Pep-7 à se fixer sur RT et inhiber l'activité polymérase. L'activité antivirale de ces variants a ensuite été étudiée en collaboration avec l'équipe du Dr. P Clayette (CEA-BERTIN). Cette étude a permis d'isoler un nouveau peptide inhibiteur P_{ID4} et d'en évaluer l'activité antivirale de P_{ID4} sur différents sous-types de VIH-1 et sur des souches résistantes aux différentes drogues actuellement utilisées en clinique.

III-2 Etude du mécanisme d'action du peptide P27 inhibiteur de l'étape de "maturation"

La deuxième partie de ce travail de thèse, a consisté à l'élaboration, sur la base du peptide Paw, du peptide P27 comme un puissant inhibiteur de l'étape de la maturation.

Nos travaux ont permis de caractériser le peptide P27 en tant qu'inhibiteur spécifique de la RT en utilisant différentes approches biophysiques. La spectroscopie de fluorescence nous a permis de déterminer l'affinité de P27 pour la RT, mais aussi son effet sur la fixation des substrats (p/t et dNTP) de la RT. Grâce à la modélisation moléculaire, le "docking" de P27 sur la RT, était nécessaire pour orienter nos études sur les éventuels sites de fixation de P27 sur la RT. En effet, nous avons utilisé la mutagenèse dirigée pour réaliser d'une part des mutations sur les résidus qui seraient impliqués dans l'interaction entre RT et P27, d'autre part des mutations impliquées dans la résistance aux NRTIs et NNRTIs. Ensuite, nous avons évalué l'action de P27 sur ces différents mutants par spectroscopie de fluorescence. Enfin P27 a été testé sur la prolifération virale de plusieurs souches virales résistantes aux médicaments, en parallèle avec une étude de toxicité cellulaire. Dans la perspective d'optimiser P27 et de proposer une molécule stable vis à vis de la dégradation, nous avons cyclisé P27 et réaliser une étude similaire à celle réalisée sur la forme linéaire de P27.

Matériels et méthodes

I Production et purification de la RT du VIH-1

I-1 Les constructions de RT

Dans toutes nos expériences, nous avons utilisé la Reverse Transcriptase (RT) recombinante exprimée et purifiée comme indiqué dans les deux paragraphes suivants. En effet, deux types de constructions de RT recombinantes ont été utilisés : une expression des sous unités séparément avec un polypeptide étiquette de 6 histidines, et une coexpression des 2 sous unités sans étiquette histidine, exclusivement utilisé pour l'analyse en chromatographie d'exclusion de taille.

I-1.1 Méthodes

I-1.1.1 RT étiquetée poly-histidines (^{His}p66/p51^{His})

La production et la purification de la protéine recombinante RT étiquetée 6 histidines (6-His), est basée sur le protocole décrit par Depollier et al. 2005 et optimisé par Agopian et al. 2009. Les fragments d'ADN codant pour les sous-unités p66 et p51 sont séparément insérés dans le plasmide pQE₃₀ (étiquette His), ensuite, ces plasmides ont été transférés dans des bactéries M15 (Qiagen Courtabeuf, France). Les bactéries sont cultivées à 37°C jusqu'à une absorbance de 0,3 à 595 nm. Les cultures bactériennes sont ensuite placées à 20°C jusqu'à une absorbance de 0,6 à 595 nm puis induction avec 0,5 mM d'isopropyl-1-β-D-galactopyranoside (IPTG) pendant une nuit à 20°C. Les cultures bactériennes sont centrifugées à 9964 g pendant 20 min à 4 °C (BECKMAN Avanti J-25, Rotor à angle fixe JLA-8.1000). Le culot est repris dans le tampon de purification (voir ci-dessous) en présence de 10% (v/v) de glycérol, 0.1% phenylméthylsulfonylfluoride (PMSF), 0.1% de cocktails inhibiteurs de protéases (Sigma Aldrich), 0.1% de lysozyme, et conservé à -80°C. Après décongélation, le culot exprimant la sous-unité ^{His}p66 est mélangé avec le culot de la culture exprimant la sous-unité ^{His}p51 respectivement, pour permettre la dimérisation durant la sonication. Les culots sont ensuite soniqués 5 x 30s à une amplitude inférieure à 50%) dans un sonicateur BRANSON Digital sonifier, modèle 450-D (400 Watts / 20000 Hz). Le mélange est ensuite centrifugé à 60372 g pendant 45-60 min à 4 °C (BECKMAN Avanti J-25, Rotor à angle fixe JA-25.50).

Toutes les purifications des protéines ont été réalisées sur un appareil AKTA Purifier (Pharmacia). La première étape de purification consiste en une chromatographie d'affinité

pour le nickel vis-à-vis de l'étiquette poly-histidine; Le surnageant est filtré sur deux filtres successifs suivant un diamètre de pore de 0,45 μm puis de 0,20 μm respectivement. La solution filtrée est appliquée sur une colonne HisTrap chelating HP 5 ml (Amersham Biosciences) chargée en nickel et équilibrée avec un tampon à 50 mM Tris pH 7,8 contenant 150 mM NaCl et 50 mM imidazole. L'élution de la protéine RT s'effectue en appliquant un gradient d'imidazole de 10 à 80% ([imidazole] : 500nM). La RT est éluée à 65% d'imidazole équivalent à une concentration de 325 mM d'imidazole. La seconde étape de purification consiste en une chromatographie d'exclusion de taille. Les fractions contenant la forme hétérodimérique de la RT sont rassemblées et concentrées sur un filtre YM30 (cutoff à 30 kDa) jusqu'à 5 ml. La solution concentrée est appliquée sur une colonne Superdex™200 HiLaod 16/60 (Pharmacia Biosciences) équilibrée avec un tampon à 50 mM Tris, pH 7 contenant 1 mM d'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA) et 50 mM NaCl. La protéine est éluée à un débit de 0,5 ml.min⁻¹. Les fractions contenant la RT sont rassemblées puis concentrées sur filtre YM30. La concentration en RT est déterminée à 280 nm en utilisant le coefficient d'extinction molaire de p66/p51 de 260450 M⁻¹.cm⁻¹. Les fractions protéiques sont supplémentées avec 10% glycérol avant d'être stockées à -80 °C. Toutes les RT sauvage et mutées (p66^{wt}/p51^{wt}, p66^{DM}/p51^{DM}, p66^{K100I}/p51^{wt}, p66^{K101E}/p51^{wt}, p66^{K102N}/p51^{wt}, p66^{K103N}/p51^{wt}, p66^{N348I}/p51^{wt}, p66^{K102N-K103N}/p51^{wt}) ont été exprimées et purifiées selon ce protocole.

I-1.1.2 Hétérodimère de RT : Coexpression

La protéine RT recombinante non étiquetée a été coexprimée et purifiée d'après le protocole décrit par Muller et al. JBC 1989. Les bactéries *E. Coli* transformées avec le plasmide pRT66/51 co-exprimant les sous-unités p66 et p51 sont cultivées à 37°C jusqu'à une absorbance de 0,3 à 595 nm. La culture est placée à 20 °C jusqu'à une absorbance de 0,5 à 595 nm avant d'être induite avec 0,5 mM d'isopropyl-1- β -D-galactopyranoside (IPTG) sur une nuit entière. Le culot bactérien obtenu à partir d'un litre de culture est lysé avec 25 ml de tampon de lyse (25 mM Tris pH 8, 5 mM Dithiothréitol (DTT), 1 mM EDTA) supplémenté par un ajout extemporané de 1 mM phenylméthylsulfonylfluoride (PMSF), 0,1 mM benzamidine, 1 mM benzocaïne, 3,3 mg.ml⁻¹ lysosyme, 0,2 % (v/v) NP40 et incubé 15 min sur la glace. Enfin, l'ajout de 1 M NaCl dans la solution permet de compléter la lyse bactérienne laissée en incubation 15 min sur la glace. Le lysat bactérien est soniqué 5 fois pendant 30 sec à une amplitude maximale de 50% (BRANSON Digital sonifier, modèle 450-

D400 Watts / 20000 Hz), puis centrifugé à 60372 g pendant 45 min à 4 °C (BECKMAN Avanti J-25, Rotor à angle fixe JA-25.50). Les protéines du surnageant sont précipitées par le sulfate d'ammonium à une saturation de 50%, pendant 1h à 4 °C. La solution est centrifugée à 60372 g pendant 30 min à 4 °C (BECKMAN Avanti J-25, Rotor à angle fixe JA-25.50). Le culot est resuspendu dans 20 ml de tampon A : Tris 50 mM pH 8 contenant 1 mM DTT, 1mM EDTA, 25 mM NaCl, 1 mM benzocaïne, 0,1 mM benzamidine et 10% (v/v) glycérol. Ensuite l'ADN est précipité au sulfate de streptomycine (40 mg.ml⁻¹) pendant 5 h à 4 °C et éliminé par centrifugation 30 min à 60372 g 4 °C. Pour éliminer tous les sels ajoutés lors des différentes précipitations, le surnageant est dialysé à l'aide d'une cassette de dialyse 30 KDa (Millipore) contre le tampon A pendant la nuit à 4 °C. Le dialysat est passé sur une colonne échangeuse d'anions HiLoad Q Sepharose FF (Pharmacia Biosciences) équilibrée avec le tampon A. Les fractions contenant la RT sont rassemblées puis concentrées sur un filtre YM30 jusqu'à 1 - 6 ml. La solution concentrée est passée sur une colonne d'affinité dont la phase stationnaire (3,5 g de résine cellulose chargée d'ADN simple brin (Echangeuse d'anions : Sigma)) a été coulée et équilibrée dans le tampon A. La protéine RT est éluée par le tampon A supplémenté avec 500 mM NaCl et puis concentrée sur filtre YM30 jusqu'à 5 ml avant d'être appliquée sur chromatographie d'exclusion de taille Superdex™200 HiLaod 16/60 (Pharmacia Biosciences). La colonne est équilibrée avec le tampon B : 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glycérol (v/v) et 50 mM NaCl et la protéine est éluée à 0.5 ml.min⁻¹. Les fractions protéiques recueillies et concentrées sur filtre YM30 sont dosées à 280 nm puis stockées à -80 °C après avoir ajouté 10% de glycérol pour mieux les conservées.

II Les peptides synthétiques

Les peptides ont été synthétisés par le Dr G. Aldrian, responsable de la plateforme de synthèse peptidique au CRBM, Montpellier, ou par la société GL Biochem (Shangai). La méthode suivante a été utilisée pour la synthèse de Pep-7, P_{ID4}, P27, Paw, ou le peptide vecteur Pep-1:

Les peptides ont été synthétisés sur une résine Fmoc (fluorenylmethoxy)-carbonyl (Pionner, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) à une échelle de synthèse de 0,05 mmol. Les peptides sont ensuite purifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance (ou HPLC pour High Performance Chromatography liquid) en phase inverse sur C18 (colonne

Interchrom UP5 WOD/25M Uptisphère 300 5ODB, 250 mm x 21,2 mm) et identifiés par spectrométrie de masse.

Les peptides Paw et P27 sont marqués par la fluorescéine à leur extrémité C-terminale sur le groupement thiol (-SH) de la Cystéine. Pour cela, 1 mM de peptide est incubé en présence de 5 mM d' isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (un excès entre 5 et 10 fois de marqueur fluorescent) pendant 1 h à température ambiante puis sur une nuit entière à 4°C. Le peptide marqué est ensuite purifié premièrement sur une colonne d'exclusion de taille de type Nap 5 (GE Healthcare). Les fractions contenant les peptides marqués sont ensuite passés sur une colonne HPLC en phase inverse C18 (Interchrom UP5 HDO/25M Modulo-cart Uptisphere, 250 mm x 10 mm) puis les peptides sont identifiés par spectrométrie de masse.

III Mesure de l'activité polymérase de la transcriptase inverse du VIH-1

III-1 Test standard d'activité polymérase de la RT

III-1.1 Matériels

La matrice/amorce d'ARN/ADN poly(rA)-oligo(dT) et le ³H-dTTP ont été obtenus de GE Healthcare Europe et de Perkin Elmer respectivement. Le dTTP est obtenu de Roche Molecular Biochemicals, Roche Diagnostics (Meylan, France). Les filtres (membrane MF, 25 mm, 0,45 µm) utilisés pour les tests sont fournis par Millipore (Molsheim, France).

III-1.2 Méthode

L'essai de RT polymérase permet de mesurer l'activité ADN polymérase ARN dépendant, dans un test standard d'activité polymérase. La réaction se produit dans un tampon Tris 50 mM, pH 8 contenant 80 mM KCl, 5 mM DTT et 6 mM MgCl₂. La RT (10 µl à 0,3 µM) est préalablement incubée ou non en présence de concentrations croissantes d'inhibiteur peptidique (de 10 nM à 120 µM en concentration finale) pendant 23 h à 25°C. 10 µl de chaque solution soit 60 nM de RT est ensuite mis en présence de 20 µl de milieu réactionnel contenant 3 µl de tampon 10 X et des substrats de la RT soit l'équivalent de 0,3 µCi de ³H-dTTP, de 0,15 µM poly(rA)-oligo(dT) et de 15 µM dTTP. La réaction est initiée à 37 °C pendant 5 min puis bloquée par la précipitation des acides nucléiques par 5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) 20 % pendant 1h sur la glace. Les solutions sont ensuite filtrées sur

membranes Metricel® GN-6 (Life Sciences) sur un système de collecteur multipuits. Les filtres sont rincés 2 fois avec 5% de TCA puis séchés à 55 °C pendant 15 min. L'incorporation des radionucléotides est mesurée grâce à un spectromètre à scintillation liquide.

III-2 Mesure de la cinétique à l'état stationnaire

Dans nos expériences de cinétiques enzymatiques, nous avons mesuré la constante de vitesse pré-stationnaire k_{obs} et la constante de vitesse à l'état stationnaire k_{ss} correspondant à l'incorporation d'un seul nucléotide sur l'amorce d'ADN par la RT. La technique du bécher thermostaté nous a permis de mesurer le k_{ss}

III-2.1 Matériels

Les nucléotides [α - 32 P]-dATP, [3 H]-dTTP sont fournis par Amersham Biosciences (Orsey France), dGTP et dTTP ont été acquis de Roche Molecular Biochemicals, Roche Diagnostics (Meylan France), les amorces/matrices (p/t : ADN/ADN) sont fournis par Eurogentec (France).

p/t (25/45) : 45 mers 25 mers	5'-ACG TAC GTA CGT ACG TAC GTT GAG TTG GTT GGA CGG CTG CGA GGC-3' 3'-A CTC AAC CAA CCT GCC GAC GCT CCG-5'
p/t (19/36) : 36 mers 19 mers	5'-TGT GGA AAA TCT CAT GCA GTG GCG CCC GAA CAG GGA-3' 3'-T CAC CGC GGG CTT GTC CCT-5'
p/t (18/36) : 36 mers 18 mers	5'-TGT GGA AAA TCT CAT GCA GTG GCG CCC GAA CAG GGA-3' 3'-CAC CGC GGG CTT GTC CCT-5'

Les matrices et amorces sont obtenues séparément, la préparation des duplexes matrice/amorce a été réalisée comme suit : Les séquences nucléotidiques de l'amorce et de la matrice sont resuspendues séparément dans de l'eau ultrapure puis sont mélangés (1/1) dans un tampon d'hybridation (25 mM Tris, pH 7,5 et 50 mM NaCl) à une concentration finale de 100 μ M. Pour permettre l'hybridation, la solution de matrice/amorce est chauffée à 95 °C pendant 3 min puis refroidie à température ambiante pendant 1h et stockée à -20 °C.

III-2.2 Méthodes

Les mesures de cinétiques de polymérisation à l'état stationnaire ont été réalisées dans un bécher thermostaté à 37°C. Elles ont permis de déterminer les constantes de vitesse à l'état stationnaire k_{ss} , k_{ss}^{Mis} et $k_{ss} p/t^{Mis}$ des réactions d'incorporation d'une seule base par les RT sauvage et mutées. La RT (250 nM) est préalablement incubée en présence de 2 μ M de p/t (25/45). Puis 10 μ M de [α -32P]dATP sont ajoutés à la solution de RT-p/t dans le bécher et des fractions de la réaction sont collectées et "quenchées" par 0,5 μ M EDTA à des intervalles de temps bien définis. Dans les fractions "quenchées", les acides nucléiques présents sont précipités en ajoutant 5 ml d'acide Trichloroacétique (TCA) à 20%, puis incubés pendant 1 h sur glace. Ensuite, les solutions sont filtrées sur des membranes-MF en utilisant un collecteur multi-puits sous vide de chez Millipore (Molsheim France). Les filtres sont rincés deux fois avec du TCA 5%, puis séchés à 55°C pendant 15 minutes. La quantification de l'incorporation des radionucléotides est effectuée par un compteur à scintillation liquide. Le taux d'ATP incorporé en fonction du temps est ensuite analysé en utilisant une régression non linéaire (GraFit, Erithacus Software). La réaction d'incorporation d'erreur de base telle que le dTTP à la place du dATP a aussi été mesurée au bécher thermostaté à 37°C selon le même protocole décrit précédemment. La réaction d'incorporation du dATP a été mesurée aussi dans un bécher thermostaté à 37°C selon le même protocole.

IV Les tests antiviraux

Les activités antivirales des peptides ont été réalisées selon la méthode publiée par (Roisin, Robin et al. 2004). Les tests d'activités antivirales ont été effectués en collaboration avec le Dr P. Clayette (BIO CEA, Fontenay-aux-Roses, France). Des cellules mononuclées du sang circulant (PBMC) sont activées par la phytohémagglutinine-P (PHA-P) puis traitées avec le peptide par des concentrations croissantes. Une heure plus tard, ces cellules sont infectées par la souche de référence VIH-1 LAI ou par des souches résistantes aux différents traitements, à 100 fois la dose effective correspondante à l'infection de la moitié de la culture cellulaire (50% Tissue Culture Infective Dose : TCID₅₀). Le virus est amplifié *in vitro* sur les PBMC

activée par la PHA-P. Le stock viral est titré et la TCID₅₀ est calculée en utilisant la formule de Kärber (Kärber 1931). La concentration en peptide est maintenue dans la culture cellulaire puis le surnageant des cellules est collecté 7 jours après l'infection et stocké à - 20°C. La réplication virale est mesurée en quantifiant l'activité de la RT dans le surnageant des cultures cellulaires. En parallèle, la cytotoxicité des peptides est évaluée sur des PBMC activées par la PHA-P non infectées au 7^{ème} jour par un test colorimétrique 3-(4-5diméthylthiazol-2-yl)2,5 diphenyl tetrazolium bromite (MTT). Les expériences sont réalisées trois fois et répétées avec un autre donneur de sang. L'analyse des données est réalisée avec le logiciel SoftMax®Pro 4.6. Le pourcentage d'inhibition de l'activité de la RT ou la viabilité des cellules est tracé en fonction de la concentration en peptide puis analysé en utilisant une équation quadratique qui permet de déduire la concentration efficace en peptide pour inhiber 50% l'activité RT (EC₅₀) et la concentration cytotoxique (CC₅₀).

V Internalisations cellulaires des peptides thérapeutiques : notion de "Cell penetrating peptides (CPPs)"

Les peptides présentent de nombreux avantages. Ils peuvent avoir une forte activité pharmacologique à de très faibles concentrations (leur EC₅₀ est de l'ordre du nM). Ils sont également facilement modulables puisqu'on peut modifier leur séquence pour les adapter à différents cas. Cependant, l'une des limitations majeures de plusieurs molécules thérapeutiques, dont les peptides, consiste en leur faible capacité à traverser la barrière membranaire pour atteindre leur cible à intracellulaire. En effet les membranes biologiques constituent un cloisonnement séparant deux espaces et sont formées d'une bicouche de lipides à tête polaire orientée vers l'extérieur et à queue hydrophobe orientée vers l'intérieur de la bicouche, contenant des glycoprotéines. Elles sont une véritable barrière imperméable à certaines molécules polaires et aux peptides (Garcia-Saez et al.2010). Dans le but d'internaliser efficacement nos peptides inhibiteurs de la RT et donc d'augmenter leur biodisponibilité, nous avons eu recours à des transporteurs « permissifs » de la membrane, en particulier, le vecteur peptidique (Pep-1) utilisant une stratégie de couplage non covalent (Deshayes et al. 2005).

Pep-1 (Ac-KETWWETWWTEWSQPKKRKV-Cya) est un peptide amphipatique primaire de 21 résidus, qui a été élaboré et développé dans notre laboratoire pour transporter des peptides

et des protéines dans la cellule. Acétylé en N-terminal, Pep-1 est composé d'un domaine N-terminal hydrophobe associé à un domaine C-terminal hydrophile. La séquence hydrophobe provient d'un motif riche en tryptophanes (KETWWETWWTEW) nécessaire pour l'interaction avec la membrane, mais aussi responsable d'interactions hydrophobes avec les protéines. Ce motif riche en tryptophanes est associé via trois résidus jouant le rôle de « linker » (SQP) à la région C-terminal riche en lysine (KKKRKV), dérivée de la Séquence de Localisation Nucléaire (NLS) de l'antigène T du virus SV40. L'extrémité C-terminale porte une fonction cystéamide (CH₂-CH₂-SH). Le « linker » préserve l'intégrité des deux domaines hydrophile et hydrophobes et les groupements Acétyle et Cystéamide jouent un rôle important dans la stabilité et le mécanisme de pénétration cellulaire de Pep-1 (Figure 26).



Pep-1Ac---KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-----Cya

Figure 26 : Représentation schématique des caractéristiques amphipathiques de Pep-1

Lorsque Pep-1 est associé aux peptides inhibiteurs de la RT, respectivement dans les proportions (10/1), les complexes ainsi formés pénètrent efficacement dans les cellules infectées, libèrent les peptides inhibiteurs et bloquent la prolifération virale (Figure 27).

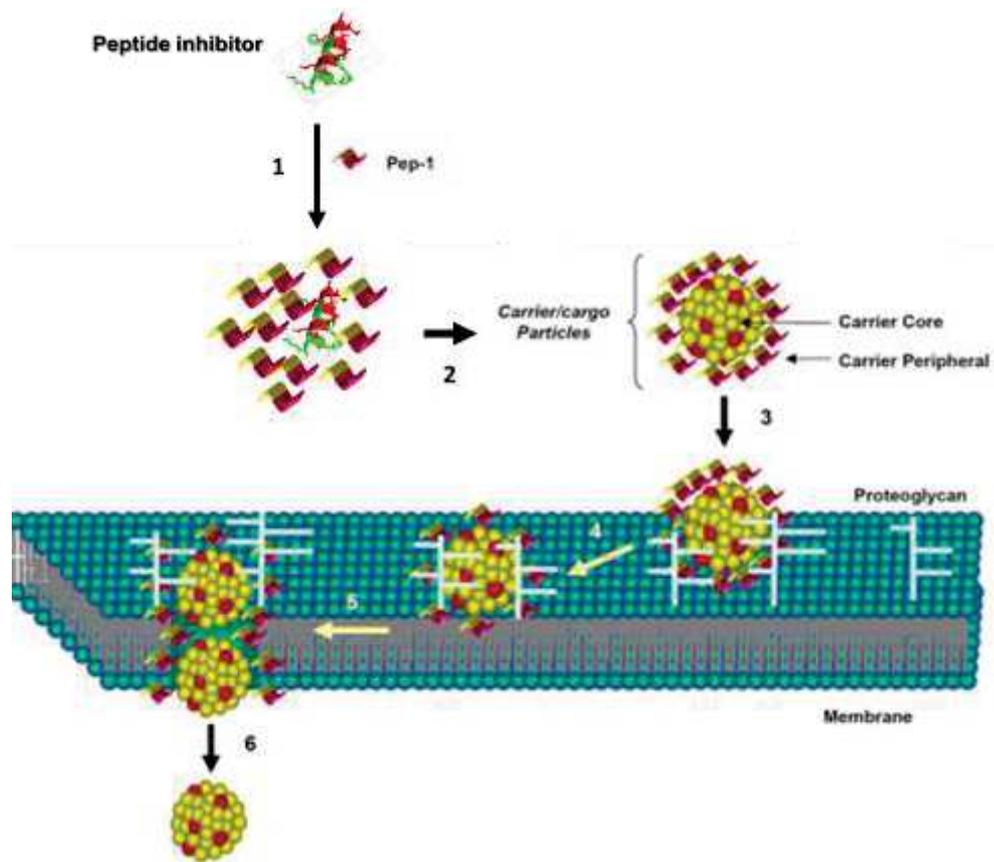


Figure 27: Mécanisme de transport des peptides inhibiteurs par le peptide vecteur Pep-1
1/ Formation de particules par des interactions électrostatiques et hydrophobes entre plusieurs molécules de Pep-1 et le cargo (peptide inhibiteur). 2/ Stabilisation des complexes cargo/vecteur par la formation d'une couche périphérique externe de plusieurs molécules de Pep-1. 3/ Interaction des complexes préformés avec les protéoglycanes de la surface membranaire. 4/ Interaction avec les phospholipides membranaires. 5 / insertion des complexes dans la bicouche membranaire grâce à la couche périphérique externe des vecteurs. 6/ Relargage et libération du cargo dans le cytoplasme.(Adapté de Konaté et al. 2010)

VI Mesure d'interactions

Les expériences d'interaction entre RT et Peptide marqué à la FITC ou entre acides nucléiques et RT sont réalisées selon deux approches : la chromatographie d'exclusion de taille et la spectroscopie de fluorescence.

VI-1 La Chromatographie d'exclusion de taille

La chromatographie d'exclusion de taille a été réalisée en utilisant une colonne HPLC de résolution de haute performance (Phenomenex S3000) ou deux colonnes HPLC disposées en série (Phenomenex BioSep-SEC S3000 suivit de Phenomenex BioSep-SEC S2000, les deux de dimension 7.5mm x 300 mm) (Restle, Muller et al. 1990). Ces colonnes sont utilisées sur un appareil AKTA Purifier de "Pharmacia" pour réaliser les différentes analyses chromatographiques. Les échantillons contenant 3 à 10 μM de RT ou de p51 sont injectés sur l'une ou les deux colonnes puis élués avec un tampon phosphate de potassium 200 mM, pH7 à un débit de 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. La RT est détectée grâce à l'excitation des tryptophanes intrinsèques à 280 nm tandis que le peptide P27-FITC est détecté grâce à l'excitation du FITC à 492 nm.

VI-2 Interaction spécifique entre RT et peptides marqués à la FITC

Pour déterminer l'affinité de P27 pour la RT, nous avons pré-incubé pendant 2 h, P27- FITC (100 μM) avec 10 μM de RT en présence d'un excès de mélange de protéines (Aldolase et BSA) obtenues de GE-healthcare France. Le mélange de peptide/protéines a été analysé sur la colonne BioSep-SEC-S 3000 à deux longueurs d'ondes, 280nm pour suivre les protéines et 492nm pour suivre le peptide P27-FITC, et ensuite élué en tampon phosphate de potassium 200 mM, pH7.

Dans une deuxième expérience, la RT pré-incubée avec P27 est partiellement dissociée par 10% d'acétonitrile pendant 30 min avant d'être passé sur les deux colonnes HPLC montées en série. C'est ce qui nous permet de déterminer si P27 est spécifique à l'un des deux monomères p66 ou p51, ou s'il est spécifique de la forme dimérique de RT. Il est à noter que l'acétonitrile est utilisé comme agent dénaturant réversible de la RT (Divita et al. 1995c). En effet, ce solvant organique permet la dissociation réversible du dimère, en abolissant les interactions

hydrophobes. Diluées dans un tampon sans acétonitrile, les 2 sous-unités dissociées peuvent se réassocier pour reformer l'hétérodimère RT biologiquement actif, pourvue de ses activités catalytiques. Dans cette expérience, l'acétonitrile est utilisé à 10% (v/v) pour dissocier partiellement la RT et donner les fractions monomériques de p66 et de p51 ainsi qu'une fraction de dimère RT. Toutefois, des tests ont montré que 17% d'acétonitrile (v/v) dissocient entièrement la RT. Notamment, afin d'évaluer l'influence du peptide P27 sur la dissociation de l'enzyme, la RT (10 μ M) a été dissociée en présence ou non de P27-FITC (100 μ M) par 17% acétonitrile (v/v) pendant 30 min à température ambiante. Les échantillons sont ensuite analysés en HPLC par chromatographie d'exclusion de taille pour estimer le taux des formes monomériques et dimériques (Agopian et al.2009).

VI-2 Mesures d'affinité des différents interacteurs de RT par spectroscopie de fluorescence.

La spectroscopie de fluorescence est une technique qui permet de détecter et de mesurer le changement de l'environnement d'une sonde fluorescente, suite à une interaction avec une autre molécule. Pour mesurer les cinétiques de variation de fluorescence à l'état d'équilibre stationnaire, les expériences fluorimétriques sont réalisées dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8, mM KCl, 10mM MgCl₂ et 1 mM DTT à 25°C en utilisant un spectrofluorimètre SPEX-PTI dans une cuve de quartz de 0.5cm de largeur, avec une bande passante en excitation et en émission de 2 nm chacune. Les spectres d'émission ont été recueillis entre 500 et 600 nm après excitation à 492 nm. Dans ces expériences de fluorescence, des concentrations fixes de peptide-FITC (200nM) ou de matrice/amorce p/t-FAM (50nM) sont titrées par des concentrations croissantes de RT (5nM à 1 μ M).La fixation du dGTP sur le complexe RT/p/t-FAM a été réalisée d'après le protocole décrit par (Rittinger et al.1995 ; Agopian et al. 2007). Une concentration fixe de RT/matrice/amorce-FAM (100nM) est titrée avec des concentrations croissantes de dNTP (5nM-50 μ M). Les interactions sont mesurées en suivant la variation d'intensité de fluorescence à 512 nm (maximum d'émission du FITC ou du FAM après excitation à 492 nm). Les données sont analysées grâce au logiciel GraFit (Erithacus Software) en utilisant l'équation quadratique (Rittinger, Divita et al. 1995) suivante :

$$F = F_{\max} - \frac{(p+L+K) - \sqrt{(\sqrt{(p+L+K)^2 - 4 * p * L})}}{2 * p} * (F_{\max} - F_{\min})$$

F : Variation de l'intensité de fluorescence
F_{max} : Valeur maximale de l'intensité de fluorescence
F_{min} : Valeur minimale de l'intensité de fluorescence
p : concentration du fluorophore
L : concentration du ligand
K = K_d : Constante de dissociation

Tableau 3 : Définition des différentes variables de l'équation quadratique F

Pour les expériences de déplacement, nous avons choisi des concentrations équimolaires de RT et du p/t-FAM de 200nM, concentration nettement supérieure à la constante de dissociation (K_d 16nM) déterminant l'affinité entre les deux, dans le but d'éviter tout bruit de fond relatif à l'un des partenaires d'interaction (RT ou p/t-FAM) qui serait libre dans la cuve. La titration à l'équilibre du complexe RT/p/t-FAM (200nM) est réalisée par des concentrations croissantes de p/t (5nM à 1µM), ensuite les données sont traitées selon l'équation quadratique décrite ci-dessus (Grafit, Erithacus Software).

VII Etudes d'interaction par SPR

VII-1 Principe

Le principe du système BIAcore basé sur la technologie SPR (Surface Plasmon Résonance) consiste à mesurer en temps réel, des interactions biologiques sans aucun marquage de molécules. L'avantage majeur de cette technique est de pouvoir visualiser les cinétiques des interactions afin de déterminer les constantes d'association et de dissociation. La modification de résonance induite par toute interaction moléculaire à la surface d'une lamelle réactive (appelée *sensor chip*) est enregistrée en continu. Cette modification est directement proportionnelle à la masse de molécules fixées sur la lamelle. Le sensor chip est une lamelle

de verre recouverte d'une fine pellicule d'or (épaisseur 50 nm) riche en électrons libre sur laquelle est déposée une couche de carboxyméthyle dextran. C'est sur cette dernière qu'est fixée la première molécule impliquée dans l'interaction à étudier. Le deuxième partenaire de l'interaction est amené au contact de la molécule fixée par un circuit d'injection à flux constant. De la lumière polarisée est dirigée sur un prisme de verre en contact direct avec la sensor chip. La réduction de l'intensité de la lumière réfléchi à un angle de résonance défini, combinée à la propagation de l'onde évanescente est observé dans le faisceau réfléchi (Figure 28). Cet angle varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu dans lequel baigne le dextran, c'est-à-dire qu'il sera d'autant plus important que la quantité de protéines liées sera forte. Le signal est exprimé en unité de résonance (RU) : 1000 RU correspondent à la fixation de 1 ng de protéine par mm² de surface.

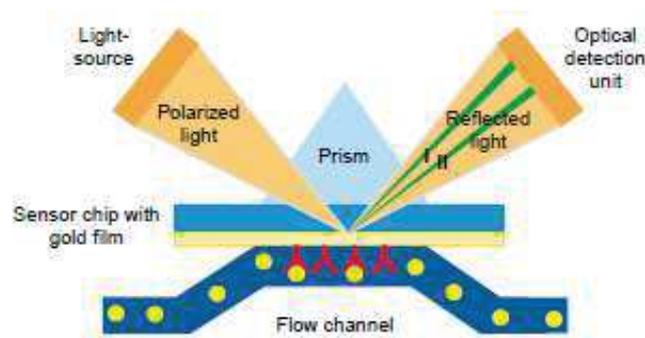


Figure 28 : Illustration schématique de l'appareil Biacore

(source : www.biacore.com)

VII-2 Mesure d'interaction

Les expériences d'interaction sont réalisées sur le Biacore 3000 (Biacore AB-USA) à 25°C. Les RTs et les différentes sous unités sont fixées sur des "sensor chip" de carboxyméthyle dextran utilisant le couplage NHS/EDC (: N-HydroxySuccinimide/ N-Ethyl-N'-(3-Diméthylaminopropyl)Carbodiimide)) comme décrit par le fabricant. Les échantillons des peptides sont préparés à différentes concentrations dans l'intervalle de 50 à 1000 nM, dans un tampon contenant 50 mM Tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, et 50 mM KCl.

Ces échantillons (30 μ l) sont injectés à un débit de 10 μ l.s⁻¹ sur la surface de détection. Après l'achèvement de la phase d'injection, la dissociation est réalisée sur 200s au même flux. Les sensorgrammes des constantes apparentes d'association et de dissociation obtenus sont analysés avec le logiciel BIA evaluation version 3.0. et les courbes de titration sont déterminées en utilisant le modèle simple de "Langmuir "1/1 de réaction à deux étapes.

VIII Mesures de la structure par Dichroïsme Circulaire (CD)

Le dichroïsme circulaire correspond à la différence entre le coefficient d'extinction molaire de deux lumières polarisées de façon circulaire à droite et à gauche. Ainsi, une molécule active optiquement possède un dichroïsme circulaire.

Les expériences de dichroïsme circulaire sont réalisées avec des peptides repris dans des solutions aqueuses d'eau ultra-pure où l'on ajoute des concentrations croissantes de Trifluoroéthanol TFE (15 à 50% v/v) pour tester la versatilité de la structure des peptides, notamment en adoptant une conformation en hélice α . Les mesures se font sur un appareil spectrophotomètre Jasco 810, dans une cuve de quartz de 1 mm de trajet optique. L'acquisition des spectres est effectuée entre 185 et 260 nm à 10nm/min et avec une bande passante de 1 nm, sur la base de trois accumulations moyennées et corrigées de la ligne de base. La position des bandes est obtenue après application de la méthode de Savitzky-Golay.

Résultats et discussion

PARTIE I : Peptides inhibiteurs de la dimerisation de RT :
Elaboration et étude du mécanisme d'action du peptide P_{ID4} inhibiteur de la
dimérisation de la RT, dérivé du peptide Pep-7

I Optimisation du peptide de départ Pep-7 en P_{ID4}

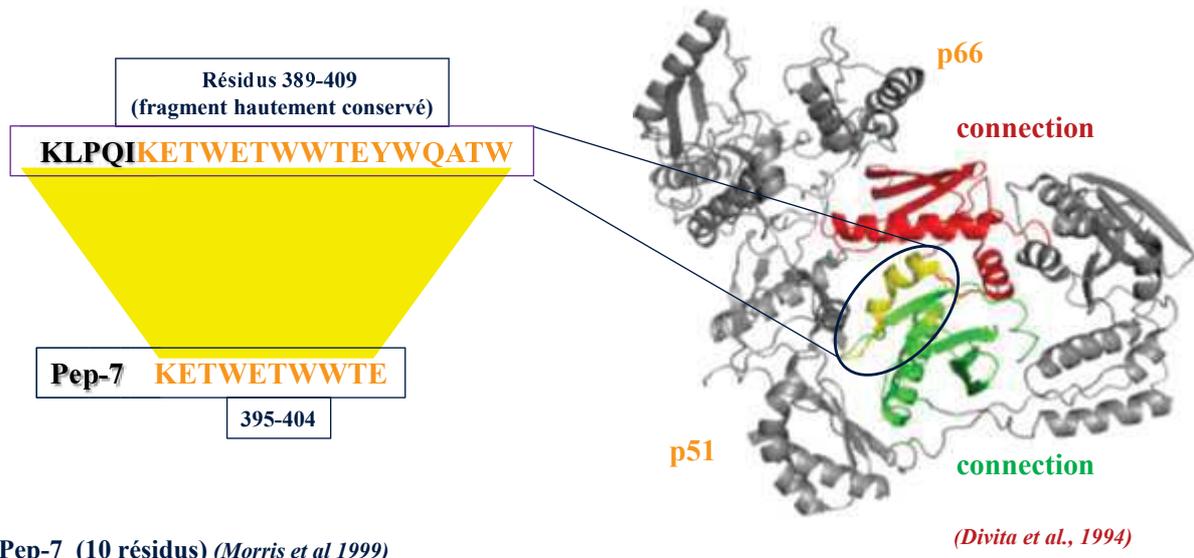


Figure 29 : Conception de Pep-7

Identification cation à l'interface de 2 sous unités de RT d'un motif hautement riche en Trp , impliqué dans le maintien du dimère au niveau des 2 domaines de connexion à partir du quel Pep-7 est élaboré.

Le Pep- 7 dérive du cluster de tryptophane localisé dans le domaine de connexion a été élaboré en tant qu'inhibiteur potentiel de l'étape de la dimérisation de la RT (Figure 29) (Depollier et al.2005 ; Morris et al. 1999). Dans le but de déterminer son site de fixation sur la RT et donc de mieux comprendre son mécanisme d'action, nous avons réalisé une étude *in silico* par modélisation moléculaire et "docking" du peptide Pep-7 sur RT en se basant sur les structures cristallographiques de la RT.

I-1 Evaluation du site de fixation par mesure du "docking" de Pep-7 sur RT

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. M. Botta par Valentina Corradi (Université de Siena). Afin de définir et d'identifier le site de fixation de Pep7, nous

avons eu recours à trois techniques. En combinant les données de criblage par SPR avec la structure cristallographique aux rayons X des RTs sans ligand ou associée à de l'ADN, un modèle de la structure du peptide Pep-7 fixé à RT a été élaboré (Figure 30A). La structure du peptide Pep-7 a été calculée en hélice en tenant compte du fait que ce peptide dérive de l'hélice α L de la RT et que nous avons montré qu'il adopte une structure hélicoïdale par dichroïsme circulaire. Deux modèles possibles de faible énergie de liaison du peptide ont été obtenus en utilisant la structure du peptide en hélice α , grâce à des simulations d'accrochage robustes et semi-rigides du peptide sur la sous unité p51 de RT. De plus, les deux modèles obtenus ont été optimisés grâce à une simulation de dynamique moléculaire 1ns. La première orientation (Figure 30B) a présenté la meilleure valeur d'énergie de "docking". Les principaux contacts entre la protéine et le ligand impliquent de nombreux résidus de RT qui entrent en contact avec les amino acides Lys¹, Trp⁷, Trp⁸ de Pep-7 et dont certains s'étendent au Trp⁴. La Lys¹ de Pep-7 s'engage dans des ponts salins avec D76 et R78 de la sous-unité p51, tandis que Trp⁷ du peptide est impliqué dans une interaction cation- π avec la chaîne latérale de K395 de p51. L'interaction stable de Trp⁸ de Pep-7 est située dans une petite poche définie par P25, W24 et T400 de la sous-unité p51 et par Q373 et T377 de la sous-unité p66. Toutefois, dans cette fixation des nombreuses autres interactions sont impliquées dans la liaison du peptide à RT, y compris des liaisons hydrogènes, des ponts salins, ainsi que des liaisons van der Waals et des interactions hydrophobes avec V21, K22, W24, W414, F416 de p51. Lors de la simulation de dynamique moléculaire, la chaîne latérale de la Lys¹ du peptide se stabilise dans la fente formée par F61, D76, R78, E399, W402 et W414 de la sous-unité p51, formant des liaisons hydrogène avec plusieurs de ces résidus, tandis que le Trp³ du peptide fait une interaction π - π en forme de T avec F416 de p51. Les interactions de Lys¹ et Trp⁸ du peptide avec respectivement, F61 et W402 de p51 induisent d'importants changements conformationnels affectant l'orientation de F61 et W402 de p51.

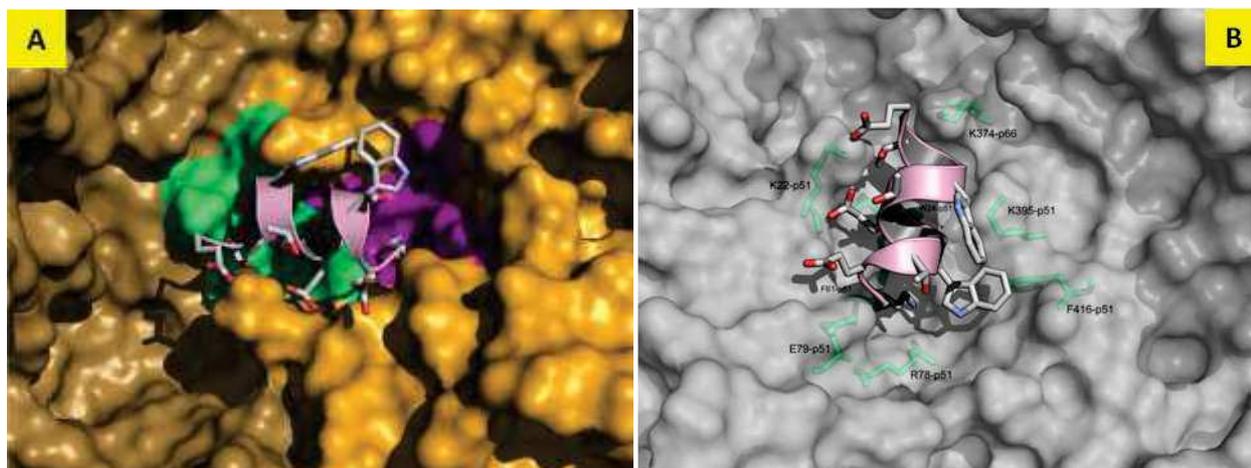


Figure 30 : Modèle "in silico" du site d'interaction RT/Pep-7. Le modèle a été obtenu après 1 ns de simulation de dynamique moléculaire. A/ les surfaces des sous unités p66 et p51 sont respectivement de couleur marron et orange. En vert correspond la poche contenant les résidus stabilisant la Lys¹ de Pep-7 et en magenta celle stabilisant le Trp⁷ du Pep-7. B/ Représentations des différents résidus de la RT interagissant avec Pep-7

La modélisation moléculaire par le 'docking' de Pep-7 sur la RT et l'étude cristallographique de cette enzyme décrit dans la figure 29, ont permis de localiser le site de fixation de Pep-7 sur la RT. Il se trouve dans une poche entre les sous domaines fingers, connexion de p51 et le sous domaine connexion de P66 impliquant des contacts avec le cluster des tryptophanes et ce contact peut être étendu à deux résidus aromatiques hautement conservés, W24 et F61 (Figure 31), identifiés par mutations sélectives en glycine. Ces deux résidus, W24 et F61 établissent des liaisons avec des résidus du sous domaine de connexion W402 et E399 pour W24 et W402, W403, I411 pour F61. Ces deux résidus sont essentiels dans l'organisation structurale et les activités biologiques de la RT (Fisher et al. 2003; Depollier et al. 2005 ; Agopian et al.2007). De surcroît, ils sont nécessaires à la fixation et au bon positionnement de l'amorce/matrice, ainsi qu'aux changements conformationnels indispensables pour les activités de l'enzyme (Agopian et al.2007 ; Fisher et al.2002)..

Nous avons démontré dans ce modèle l'implication des résidus Lys¹, Trp⁴, Trp⁷ et Trp⁸ du peptide dans l'interaction avec RT d'une part et d'autre part l'importance de W24 et F61 pour l'enzyme. Dans la suite de ce travail nous avons étudié l'impact de ces résidus dans la fixation de Pep 7 et ces dérivés sur RT.

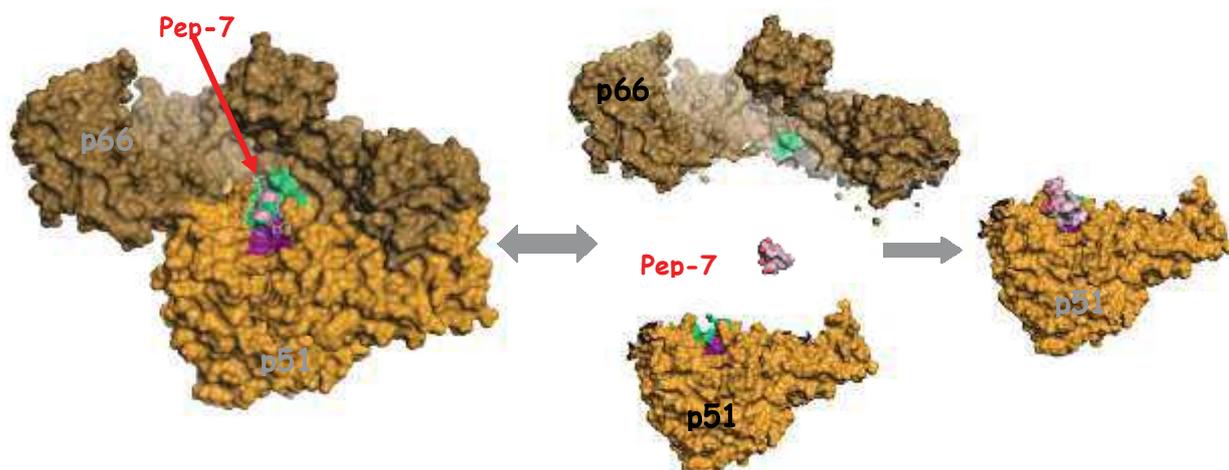


Figure 31: Mécanisme d'action de Pep-7.

Le peptide Pep-7 induit la dissociation du dimère RT en se fixant préalablement sur la sous-unité p51. La fixation de Pep-7 entraîne un changement de conformation de p51 déstabilisant la forme dimérique et entraînant la dissociation.

I-2 Etude et optimisation de la séquence de Pep-7

Dans le but d'optimiser Pep-7, nous nous sommes basés sur les résultats de "docking" *in silico* pour réaliser dans un premier temps un "scanning alanine" sur la séquence de Pep-7, et dans un deuxième nous avons muté spécifiquement les résidus Lys¹, Trp⁴, Trp⁷ et Trp⁸ en alanine (Tableau 4). Compte tenu du fait que les Trp jouent un rôle important dans l'interaction, nous avons élaboré des mutations d'un, deux ou trois de ces tryptophanes en alanine ou en phénylalanine. Enfin, nous avons aussi réduit le peptide en N-terminal et C-terminal (Tableau 4). La fixation des différents peptides et l'affinité sur les RT^{wt} et RT^{DM} ont été évaluées en utilisant la technique de "Surface Plasmon Resonance" (SPR) (Figure 32;Tableau 4). La méthode de SPR permet de mesure de l'affinité d'un ligand pour un récepteur fixé sur des "sensor chips". La détection SPR mesure la variation de l'indice de réfraction au voisinage de l'interface quand le ligand se fixe aux récepteurs. Les peptides sont sélectionnés sur la base de leur capacité à se lier sur RT^{wt}, mais aussi sur la RT portant les mutations W24 et F21 sur les sous-unités p51/p66(RT^{DM}). En effet, il a été démontré que ces mutations interfèrent avec la fixation de Pep-7 sur la RT (Depollier et al.2005). Dans un premier temps, les RTs (Sauvage et mutant) sont fixées sur des bio-puces par leur étiquette 6-His en utilisant la technique de

couplage NHS/EDC, puis un flux de concentration croissante des différents peptides est appliqué sur ces RTs fixées. Pour le calcul des constantes de dissociation (Tableau 4), les données des phases d'association et dissociation (Figure 32) ont été analysées en utilisant le modèle de "Langmuir" correspondant à une réaction en deux étapes.

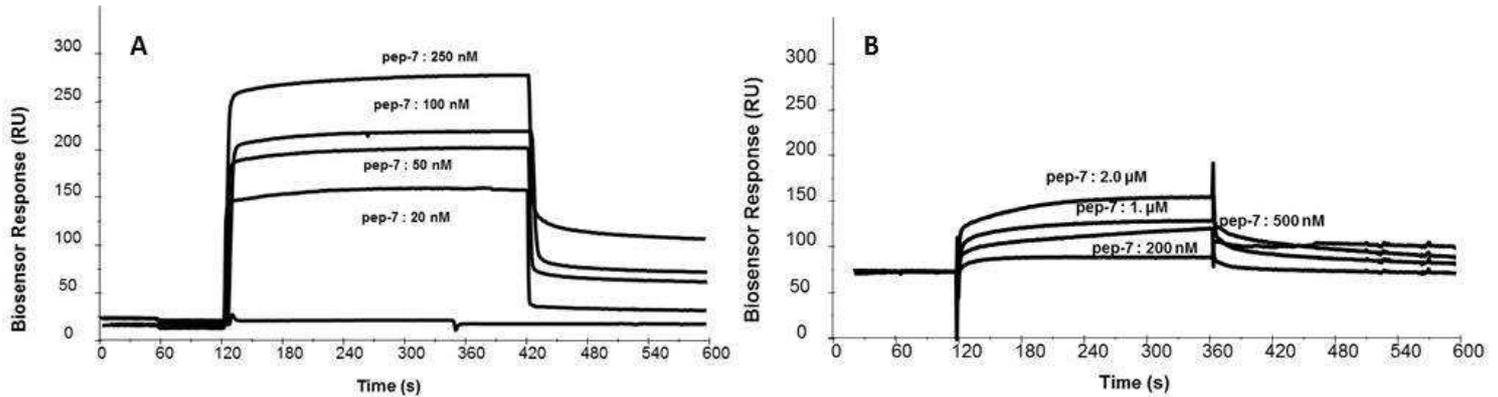


Figure 32 : Fixation de Pep-7 sur RT par la technique SPR

Des concentrations croissantes de Pep-7 sont injectées sur (A) RT^{WT} et (B) RT^{DM} fixée préalablement sur les plaques. 200s au même flux. Les sensorgrammes des constantes apparentes d'association et de dissociation obtenus sont analysés avec le logiciel BIA evaluation version 3.0. et les courbes de titration sont déterminées en utilisant le modèle simple de "Langmuir" 1/1.

Peptides	Sequence	K _d (nM)	
		RT ^{wt}	RT ^{W24G/F61G(DM)}
Pep-7	KETWETWWTE	152 ± 24	2100 ± 320
Pep-71	AETWETWWTE	1800 ± 120	5200 ± 270
Pep-72	KATWETWWTE	120 ± 17	2700 ± 110
Pep-73	KEAWETWWTE	250 ± 20	2300 ± 280
Pep-74	KETAETWWTE	136 ± 21	512 ± 34
Pep-75	KETWATWWTE	215 ± 32	4400 ± 180
Pep-76	KETWEAWWTE	850 ± 27	6400 ± 320
Pep-77	KETWETAWTE	1890 ± 120	>10000
Pep-78	KETWETWATE	2450 ± 20	>10000
Pep-79	KETWETWWAE	980 ± 40	>10000
Pep-80	KETWETWWTA	144 ± 10	1820 ± 240
Pep-81	KETWETWWE	160 ± 20	2430 ± 207
Pep-82	KETAETAET	ND	ND
Pep-83	KETAETAWET	>10000	ND
Pep-84	KETAETWAET	7980 ± 320	ND
Pep-85	KETWETAET	ND	ND
Pep-86	ETWETWWTE	4500 ± 210	>10000
Pep-87	RETWETWWTE	230 ± 45	2150 ± 180
Pep-88	KETFETFFTE	2700 ± 320	>10000

Tableau 4 Caractéristiques des peptides dérivants de Pep-7

Les différentes séquences des peptides sont représentées avec leurs affinités correspondantes pour la RT^{wt} et RT comportant les deux mutations W24G et F61G (RT^{DM}). Les études de fixation des différents peptides pour les RTs ont été réalisées par mesure en surface plasmon resonance (SPR- Biacore. (ND :Non déterminée)

Le peptide original Pep-7 présente une forte affinité pour la RT^{wt} avec une constante de dissociation K_d = 152 ± 24 nM, alors qu'il se fixe faiblement sur le double mutant RT^{DM} (K_d = 2.1 ± 0.3 μM). Par ailleurs, le peptide dépourvu de Tryptophane (Pep-84) qui n'interagit pas avec la RT a été utilisé comme contrôle négatif. Dans ces expériences les peptides présentant une mutation des résidus Gln², Thr³, Gln⁵, et Gln¹⁰ en alanine (Pep-72, Pep-73, Pep-75, et Pep-80) ne sont pas affectés dans leur fixation sur la RT. Au contraire, les peptides mutés sur

les acides aminés Lys¹, Thr⁶, Trp⁷, Trp⁸ et Thr⁹ se fixent faiblement ou quasiment pas à la RT. La position des résidus le long de la séquence peptidique à elle seule ne suffit pas à expliquer le potentiel de fixation du peptide. En effet, les mutations Lys^{1Arg}, Thr^{6Ser} et Thr^{9Ser} ne changent en rien l'affinité de ces peptides vis-à-vis de la RT, suggérant ainsi que la nature de la chaîne latérale des acides aminés impliqués est aussi importante dans l'activité de ces peptides.

Les groupements Trp du peptide sont un prérequis à la fixation sur la RT. Lorsque deux ou trois mutations des tryptophanes sont associées chez Pep-7, l'affinité est complètement abolie entre ces peptides et RT, et ceci quels que soient les Trp mutés (Pep-82, Pep-83, Pep-85). De plus, la mutation de Trp en un autre résidu aromatique (Phe) abolit également la liaison du peptide à la RT (Pep-88), suggérant ainsi que la chaîne latérale des tryptophanes et la présence des noyaux indoles sont essentiels à l'interaction. Sur la base des résultats de fixation des peptides, nous pouvons proposer une séquence minimale d'inhibition (KxxAxTWWTx). Le peptide optimal nécessite un résidu chargé en N-terminal Lys/Arg, deux résidus avec le groupement hydroxyle polaire sur les positions 6 et 9, et deux Trp en position 7 et 8. De façon très intéressante la mutation du Trp⁴ en alanine (Pep-74) n'affecte pas l'affinité pour la RT^{wt} (Kd = 136 ± 20 nM), mais à la différence de Pep-7, Pep-74 (P_{IDA}) se fixe sur le double mutant RT^{DM} avec une constante de dissociation Kd = 512 ± 17nM.

I-3 Evaluation anti-polymérase et antivirale des peptides dérivés de Pep-7

Les différents peptides dérivés de Pep-7 ont été testés *in vitro* et *in cellulo* respectivement pour leur activité anti-polymérase et antivirale. D'un point de vue du mécanisme moléculaire, en se fixant RT, Pep-7 induit un changement de conformation qui entraîne la déstabilisation du dimère suivi de la dissociation des deux sous-unités p51 et p66 (Figure 31). Ce mécanisme se traduit par une forte activité antiviral (EC₅₀ = 0.17nM), et anti-polymérase (Ki = 0,24μM) de Pep-7.

I-3.1 Activité anti-polymérase des peptides dérivés de Pep-7

L'activité polymérase de la RT est mesurée après incubation de RT avec les différents peptides pendant 12 heures afin de permettre sa dissociation par les peptides. ceux-ci ont été

évalués dans un test standard d'activité polymérase de la RT et les constantes d'inhibition K_i ont été obtenues grâce à la représentation de Dixon ($1/V = f([\text{peptide}])$) (Tableau 5 et Figure complémentaire 1 Annexes). Les résultats (Tableau 5) démontrent que la mutation de la Lys¹ en Ala (Pep-71) entraîne une nette diminution de l'activité anti-polymérase ($K_i = 52\mu\text{M}$). La délétion de cette Lys (Pep-86) supprime complètement toute activité inhibitrice du peptide. Par contre le remplacement de cette Lys¹ par un autre acide aminé chargé positivement, l'Arg (Pep-87), permet de rétablir partiellement le potentiel anti-polymérase du peptide. La mutation des Thr⁶ (Pep-76) et Thr⁹ (Pep-79) en Ala conduit à une perte d'activité du peptide. La simple mutation en Ala des Trp⁷ (Pep-77) et Trp⁸ (Pep-78), ou double mutation Trp⁴/Trp⁷ (Pep-83) et Trp⁷/Trp⁸ (Pep-85) ou triple mutation Trp⁴/Trp⁷/Trp⁸ (Pep-82), abolit complètement l'inhibition de RT. De même, le remplacement des trois Trp (Trp⁴/Trp⁷/Trp⁸) en un autre résidu aromatique Phe (Pep-88), donne un peptide inactif. Ces données sont en parfait accord avec les études d'interaction réalisées en SPR (Tableau 4). Tout comme Pep-7, plusieurs peptides présentent une bonne activité anti-polymérase notamment, de la plus faible à la plus importante : Pep-84 ($K_i = 3.9\mu\text{M}$), Pep-80 ($K_i = 1.2\mu\text{M}$), Pep-73 ($K_i = 0.8\mu\text{M}$), et enfin Pep-74 (P_{ID4}) présente une activité ($K_i = 0.17\mu\text{M}$) du même ordre que celle de Pep-7 (Tableau 5).

I-3.2 Activité antivirale des peptides dérivés de Pep-7

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Dr. P. Clayette par Valentina Corradi (BIO CEA). Les mesures des activités antivirales sur des cellules infectées sont réalisées en associant de manière non covalente les peptides (Pep-7 et dérivés) avec un vecteur peptidique Pep-1, afin de faciliter leurs transports efficacement dans les cellules. En effet ces nanoparticules (Pep-1) augmentent de façon considérable la disponibilité des inhibiteurs dans la cellule (Morris et al.1999 ; Depollier et al.2005 ; Munoz et al.2007). La capacité antivirale des peptides dérivés de Pep-7 a été évaluée sur des cellules PBMC préalablement infectées avec la souche virale VIH-1 LAI (Tableau 5). Ces différents peptides sont complexés avec Pep-1 de façon non covalente dans un ratio peptide/Pep-1: 1/10, et les résultats obtenus dans le Tableau 5, présentent les concentrations efficaces à 50% (EC₅₀) sur des PBMCs infectées et les indices de sélectivité pour chaque peptide.

Peptides	K_i (μ M)	EC_{50} (nM)	SI
Pep-7	0.24 ± 0.1	0.171	2500
Pep-71	52 ± 18	4700	ND
Pep-72	7.5 ± 2	370	12
Pep-73	0.8 ± 0.5	9	1500
Pep-74	0.17 ± 0.09	0.18	6250
Pep-75	67 ± 10	4200	1
Pep-76	ND	ND	ND
Pep-77	ND	ND	ND
Pep-78	ND	ND	ND
Pep-79	ND	ND	ND
Pep-80	1.2 ± 0.5	9	270
Pep-81	34 ± 12	170	14
Pep-82	ND	ND	ND
Pep-83	ND	ND	ND
Pep-84	3.9 ± 0.8	210	52
Pep-85	ND	ND	ND
Pep-86	ND	ND	ND
Pep-87	29 ± 5	1.2	570
Pep-88	ND	ND	ND

Tableau 5: Activités antipolymérase et antivirale avec l'indice de sélectivité des peptides dérivés de Pep-7.

Les résultats du Tableau 5 montrent qu'il existe une corrélation directe entre l'activité antivirale des peptides et leur activité anti-polymérase. Les activités antivirales de ces deux peptides (Pep-7 et P_{ID4}) sont de l'ordre du "sub-nanomolaire" (EC_{50} Pep-7 : 0.17nM, EC_{50} P_{ID4} : 0.18nM). Cependant, l'activité antivirale des peptides portant la mutation sur les résidus Lys¹, Thr⁶, Trp⁷ et Trp⁸ est résiduelle ou inexistante, confirmant clairement le rôle que jouent ces acides aminés dans l'interaction avec la RT et l'inhibition de la prolifération virale. Enfin, l'évaluation de la cytotoxicité a révélé que l'indice de sélectivité de Pep-7 est compris entre 2000 à 2500 alors que celui de P_{ID4} est de 6250.

Etant donné que P_{ID4} interagit fortement, aussi bien avec RT^{wt} qu'avec $RT^{(W24G/F61G)}$, il constitue un inhibiteur potentiel et nous avons étudié en détail le mécanisme de ce peptide dans la suite de ce travail.

I-4 P_{ID4} bloque la dimérisation de la RT

La forme active de l'hétéro-dimère RT, est obtenue par l'association des deux sous-unités p51 et p66, comme nous l'avons rapporté précédemment. Le potentiel de P_{ID4} à interférer

avec le processus de reassociation de la RT a été évalué. La RT est dissociée en ajoutant 17% d'acétonitrile, ensuite la réassociation est initiée en diluant de 12 fois cette RT avec du tampon sans acétonitrile. La chromatographie d'exclusion de taille permet d'observer la réassociation de la RT en deux sous-unités (p51 et p66) (Figure 33A), et ensuite, l'activité polymérase retrouvée de ces hétérodimères est mesurée *in vitro* (Figure 33B).

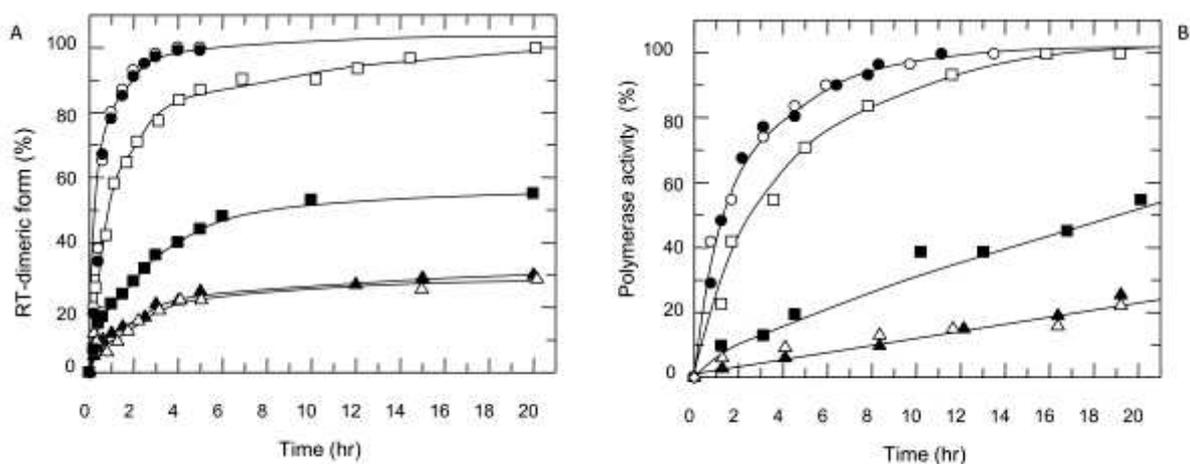


Figure 33 : Impact du peptide P_{ID4} sur le mécanisme de dimérisation de RT. $5\mu M$ de RT hétérodimérique RT^{wt} et RT^{DM} sont préalablement dissociés avec 17% d'acétonitrile à pH 7.5, $25^{\circ}C$, et la réassociation des monomères est amorcée en diluant de 12 fois les solutions dans du tampon simple sans acétonitrile, en absence (RT^{wt} : ○ ; RT^{DM} : ●) ou en présence de 10 mM de peptide Pep-7 (RT^{wt} : △; RT^{DM} : □) et P_{ID4} (RT^{wt} : ▲; RT^{DM} : ■). (A) L'Inhibition de la dimérisation de la RT a été réalisée en suivant les cinétiques de réassociation des monomères. Les échantillons de 10mg de RT sont analysés par chromatographie d'exclusion de taille en HPLC et les données obtenues sont traitées selon une réaction du 2^{ème} ordre. (B) L'inhibition des différents peptides est mesurée en suivant les cinétiques de formation de RT hétérodimérique active, quantifiée par le test d'activité polymérase

		k_{ass} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{ac} (h^{-1})
RT^{wt} :	○	$5,5 \cdot 10^4$	0,21
RT^{DM} :	●	$0,9 \cdot 10^4$	0,19
Pep-7/ RT^{wt} :	△	$0,4 \cdot 10^3$	0,014
Pep-7/ RT^{DM} :	□	$0,9 \cdot 10^4$	0,17
P_{ID4}/RT^{wt} :	▲	$0,35 \cdot 10^3$	0,017
P_{ID4}/RT^{DM} :	■	$0,7 \cdot 10^3$	0,052

Tableau 6 : Constantes d'Associations des sous unités de RT k_{ass} et activités polymérase k_{ac} de ces RT

Les constantes d'association et d'activité de RT^{wt} et RT^{DM} ont été déterminées (Figure 33, Tableau 6). Les valeurs obtenues en absence des peptides inhibiteurs sont respectivement $5.5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (RT^{wt}), $0.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (RT^{DM}) et 0.21 h^{-1} (RT^{wt}), 0.19 h^{-1} (RT^{DM}). Dans un deuxième temps, nous avons réalisé les mêmes expériences en présence de $5 \mu\text{M}$ de Pep-7 et de P_{ID4}. Dans tous les cas, la vitesse d'association des deux sous-unités p51 et p66, dépend des concentrations de Pep-7 et de P_{ID4}. Les résultats obtenus montrent que la présence des deux peptides, réduit considérablement la vitesse d'association et l'activité de RT^{wt}. En présence d'un excès de peptide, les constantes d'association sont respectivement de $0.4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Pep-7/RT^{wt}) et $0.35 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (P_{ID4}/RT^{wt}), et les constantes d'activité sont de 0.014 h^{-1} (Pep-7/RT^{wt}) et 0.017 h^{-1} (P_{ID4}/RT^{wt}). Par contre, la présence de Pep-7 ($5 \mu\text{M}$) n'affecte ni l'association, ni l'activité du mutant RT^{DM} ($k_{\text{ass}} : 0.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et $k_{\text{ac}} : 0.17 \text{ h}^{-1}$), à la différence de P_{ID4} ($5 \mu\text{M}$) qui est actif sur la RT^{wt} et la RT^{DM}. Dans les deux cas les constantes d'association et d'activité sont considérablement réduites de 10 fois [RT^{DM} ($k_{\text{ass}} : 0.7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_{\text{ac}} : 0.052 \text{ h}^{-1}$)]. Les études basées sur les analyses des vitesses de dimérisation dépendantes des concentrations des peptides, permettent de calculer des constantes d'association et d'activité proches pour les deux peptides dans le cas de RT^{wt}. Ces résultats suggèrent que Pep-7 et P_{ID4}. Par contre, seul P_{ID4} est actif sur le double mutant RT^{DM}.

II Evaluation antivirale de P_{ID4}

II-1 Effet de P_{ID4} sur les isolats des différents sous-types du VIH-1

Nos études ont montré que P_{ID4} inhibe de manière significative la réplication des souches virales VIH-1 LAI et Ba-L, appartenant toutes les deux au sous-type B. Nous avons réalisé une évaluation de l'efficacité de P_{ID4} couplé aux particules de Pep-1 sur les isolats respectifs des sous-types A, C, D, E et F du VIH-1. L'AZT a été utilisée comme contrôle positif, en tant que molécule inhibitrice de référence de la RT. Les résultats reportés dans le Tableau 7, montrent que P_{ID4} inhibe la prolifération de tous les sous-types testés. Les sous-types C, E et F ont une faible sensibilité vis-à-vis de l'AZT. En particulier, P_{ID4} est plus efficace que l'AZT de 6.8 et 5.3 fois sur les sous types C (VIH-1 4410) et F (VIH-1 2338). Nous avons analysé les séquences primaires des RTs de ces différents isolats, notamment, nous nous sommes focalisés sur les résidus qui seraient impliqués dans les contacts avec P_{ID4}. Comme reporté

dans le Tableau 7, on constate une séquence consensus bien conservée dans les différents sous type, riche en Trp. Et c'est cette séquence qui est à la base de Pep-7(KETWET/AWWTXX). D'autre part, les acides aminés impliqués dans l'interaction de Pep-7 avec la sous unité p51, en particulier Trp²⁴ et Phe⁶¹, sont aussi conservés dans les différents sous-types testés, montrant ainsi l'implication de ces derniers dans la formation du dimère RT.

Clades	Virus	Séquence Consensus	Pep1/P _{ID4} EC ₅₀ (nM)	AZT EC ₅₀ (nM)
A	HIV-1 -1650	KETWET/AWWTE/ D	39	44
B	HIV-1 LAI	K ETWET/AWW M E	0.5	6.5
B	HIV-1 ADA		7.5	7.5
B	HIV-1 2101		56	56
B	HIV-1 Ba-L		21	36
B	HIV-1 SF162		16	17
C	HIV-1 4110	K ETWE A WWT D	3.4	24
C	HIV-1 2914		60	130
D	HIV-1 1647	K ETWET/AWW X E/ D	65	85
D	HIV-1 NDK		32	31
E	HIV-1 2165	K/ R ETWE TWW M E	4.5	9
F	HIV-1 2338	K ETW D TWWT E	3.6	19
G	HIV-1 3191	K ETWE V WWT E	41	45
G	HIV-1 3187		9.6	7.5

Tableau 7 : Activité antivirale de P_{ID4} sur les isolats des différents clades primaires de VIH1

II-2 P_{ID4} inhibe la réplication des souches virales résistantes aux NRTIs et NNRTIs

Les NRTIs et les NNRTIs ont permis de réduire considérablement le développement du virus. Cependant, ces différentes molécules sont souvent confrontées à l'émergence de souches mutantes résistantes. Plusieurs mutations de résistance ont été identifiées et répertoriées; Aujourd'hui on connaît le délai d'apparition de certaines mutations suivant la molécule

utilisée. Dans notre étude, nous avons évalué le potentiel d'inhibition des peptides Pep-7 et P_{ID4} sur des mutants résistants aux NRTIs et NNRTIs. Cinq souches mutantes résistantes aux inhibiteurs nucléosidiques tels qu'à l'AZT (ARP141, ARP142 et ARP143) ; au ddI/ddC (ARP144) et celles résistantes aux NRTIs et aux NNRTIs [AZT, ddI, Nevirapine (ARP145)] ont été utilisées. Les résultats de ces deux peptides (Pep-7 et P_{ID4}) sont comparés avec ceux de l'AZT dans le Tableau 8.

Strain (RT Genotype)	Resistant	Pep-7 EC50(nM)	P_{ID4} EC50(nM)	AZT EC50(nM)
ARP141(67N, 70R, 215F, 219Q)	AZT	0.19	0.1	11
ARP142 (215Y)	AZT	0.37	0.31	25
ARP143 (41L, 215Y)	AZT	0.03	0.11	55
ARP144 (74V)	ddI & ddC	0.3	0.49	60
ARP146 (41L, 74V, 106A, 215Y)	AZT, ddI, Nevapirine,	1.0	1.9	268

Tableau 8 : Activité antivirale des peptides Pep-7 et P_{ID4} (avec l'AZT comme control) sur les mutants résistants aux différentes molécules actuellement utilisées en clinique.

Ces deux peptides sont très actifs à de faibles concentrations (nanomolaires) sur des mutants simples résistants tels que 74V et 215Y alors que la concentration nécessaire de l'AZT est de 20 à 65 fois supérieure. Le test sur les virus présentant plusieurs mutations de résistances aux différentes molécules telles que l'AZT, la ddI et la ddC, montre aussi que ces deux peptides sont aussi très actifs sur ces virus. En effet, Pep-7 et P_{ID4} présentent une forte inhibition sur les souches présentant 4 mutations de résistance à l'AZT (67N, 70R, 215F, 219Q), cette efficacité est respectivement de 200 et 100 fois supérieure à celle de l'AZT, et dans le cas du mutant multi-résistant (41L, 74V, 106A, 215Y), la potentialité des peptides est respectivement de 137 et 45 fois plus élevé que celle de l'AZT.

III Discussion

Les activités polymérase et RNase H sont les principales cibles des différentes molécules dirigées contre le VIH, ce qui avait placé la sous-unité catalytique p66 au centre des différentes études qui ont conduit à la mise en place de plusieurs drogues (AZT, ddl, EFV, Nevirapine...) actuellement utilisés dans la thérapie anti-VIH. Très peu d'études sont réalisées pour agir directement sur la sous-unité régulatrice p51, pourtant nécessaire et indispensable à l'intégrité de la forme active de l'hétéro-dimère RT. Dans cette étude, nous avons proposé de cibler la sous-unité p51 en tant que nouvelle alternative pour bloquer la dynamique conformationnelle de l'enzyme et empêcher ainsi sa dimérisation. La modélisation moléculaire du "docking" de Pep-7 associée à l'étude des structures cristallographiques de la RT ont permis de localiser le site de fixation de Pep-7 sur la RT. Pep-7 se fixe dans une poche localisée entre les sous-domaines "fingers" et connexion de p51 impliquant des contacts avec le cluster de tryptophanes du domaine de connexion étendu à deux autres résidus aromatiques hautement conservés, W24 et F61 (Figure 31). De plus, la mutation de ces deux résidus en glycine diminue considérablement la fixation de Pep-7.

L'enjeu majeur dont il faut tenir en compte, lors de la conception de nouveaux inhibiteurs de la RT est l'émergence rapide de résistance aux médicaments. Actuellement, nous n'avons pas pu sélectionner des mutants résistants contre Pep-7 et ses dérivés (P_{ID4}).

Cette absence de résistance, pouvant sans doute être associée au fait que Pep-7 et P_{ID4} ciblent le cluster de tryptophanes du domaine de connexion, jouant un rôle clé dans l'intégrité structurale de la RT. Les concentrations de Pep7 et P_{ID4} nécessaires à inhiber la prolifération virale sont 100 fois inférieures à celles requises pour bloquer l'activité polymérase de RT *in vitro*, indiquant qu'*in cellulo* le mécanisme de ces peptides ne se limite pas à bloquer l'activité de reverse transcription. Des travaux précédant de l'équipe (Depollier et al) ont montré qu'*in cellulo* la présence de Pep-7 réduit considérablement la maturation de la polyprotéine Gag-Pol, suggérant que l'homo-dimère p66/p66 pourrait être la cible de Pep-7 et ces dérivés, ou tout simplement que la maturation de la polyprotéine constituerait la cible principale de ces peptides.

Dans ce travail, nous avons mis au point une nouvelle stratégie pour limiter la résistance du virus, en ciblant la dynamique structurale essentielle au bon fonctionnement de la Reverse Transcriptase. Nous avons développé un nouvel inhibiteur anti-RT, un peptide de 10 résidus P_{ID4} pour bloquer la réplication virale en déstabilisant le dimère RT par sa fixation sur le

cluster de résidus aromatiques à l'interface entre les sous-domaines de connexion des deux sous-unités. Nous avons montré que P_{ID4} est actif sur des mutations (W24 et F61) qui peuvent affecter l'efficacité de Pep-7 si toute fois elles émergent. P_{ID4} est un puissant inhibiteur de divers isolats de VIH-1 de sous types distincts de différentes sources géographiques, et qu'il empêche la progression virale des souches ayant développé des mutations conférant une résistance aux médicaments anti-VIH nucléosidiques et non nucléosidiques les plus couramment utilisés en clinique. Un autre avantage majeur de ces inhibiteurs peptidiques est qu'ils présentent un indice de sélectivité très élevé (supérieur à 5000 dans le cas de P_{ID4}) et ne sont donc pas toxiques pour les cellules.

PARTIE II : Peptides inhibiteurs de la maturation de RT

I Elaboration du peptide P27 inhibiteur de la maturation de la RT

L'étape de la maturation constitue la deuxième phase d'activation de la RT (cf : IV-6.1), (Goody, Divita et al. 1995). Lors d'une étude précédente, Agopian et al ont identifié le peptide *Paw* comme étant capable de bloquer cette étape d'isomérisation, et donc d'inhiber efficacement l'activité polymérase de la RT sans provoquer la dissociation du dimère (Agopian et al.2009). L'objectif de cette deuxième partie de mon travail de thèse a été de comprendre le mécanisme moléculaire de ce peptide *Paw*, afin de mettre en évidence un motif inhibiteur minimum. Dans le but d'identifier les résidus importants dans l'inhibition de la RT, une série de nouveaux peptides dérivés de *Paw* ont été élaborés et évalués sur l'activité polymérase de RT ainsi que sur la prolifération virale dans un modèle de PBMC infectés avec la souche virale VIH-1 LAI (Tableau 9).

	Peptides	Ki (μ M)	EC50 (nM)
<i>Paw</i>	GTKWLTEWIPLTAEAEAC	0.7 ± 0.2	1.8 ± 0.7
P14	GTKALTEVIPLTAEAEAC	14 ± 7	---
P26	KWLTEWIPLTAEAEAC	1.8 ± 0.7	45
P24	GTKWLTEWIPLC	0.7 ± 0.05	2.3
P18	GTKALTEIPLC	53 ± 12	---
P16	GTKWLTEVWPLC	14 ± 4	3.2
P31	GTKFLTEFIPLTAEAC	>50	---
P27	GTKWLTEWIPLTAEAC	0.045 ± 0.005	0.12 ± 0.05

Tableau 9 : Activité anti-polymérase et antivirale des peptides dérivés de *Paw*.

Les séquences des différents peptides avec les 2 Trp et leurs mutations représentés en bleu. Les activités antivirales et antipolymérases sont mesurées comme reporté dans les matériels et méthodes. (--- : En cours d'étude)

L'étude des dérivés de *Paw* démontre que la délétion des résidus en N-terminal (P26) entraîne une nette réduction des activités anti-polymérase et antivirale des peptides. De même, la mutation des deux Trp en position 4 et 8 (P14 et P18), ou en phénylalanine dans le but de garder le caractère aromatique (P31), ou le déplacement de la position de ces deux Trp sur la séquence (P16), entraînent une perte de l'activité des peptides. Ces résultats suggèrent que, les

résidus en N-terminal, et la présence des deux Trp en position 4 et 8 sont indispensables pour l'inhibition de la RT. Au contraire, la réduction de la séquence Paw du côté C-terminal a peu d'impact sur l'activité inhibitrice du peptide (P24), sans toutefois améliorer l'activité des peptides, à l'exception de P27. Le peptide P27 est 15 fois plus efficace que Paw en activités anti-polymérase (Figure complémentaire 2 Annexes) et antivirale. Il inhibe l'activité polymérase ADN et ARN dépendantes, avec des constantes d'inhibition qui sont respectivement de 45 ± 5 nM et 52 ± 13 nM, et P27 bloque la prolifération virale avec une constante EC_{50} de 0.12 ± 0.05 nM (Tableau 9).

C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur P27 dans la suite de nos travaux.

II Mécanisme d'interaction de P27 avec RT

II-1 Etude de la séquence de P27

Dans le but de définir une séquence minimale d'inhibition issue de la séquence du peptide initiale Paw (GTKWLTEWIPLTAEAEAC), trois tests ont été réalisés sur Paw, P27 et sur des variants de P27 (Tableau 10):

i) L'activité Polymérase ADN-dépendante de RT a été mesurée en présence des différents peptides. P27 inhibe fortement l'activité de RT avec une constante d'inhibition K_i de 0.045nM, qui est 10 fois supérieure à celle obtenue pour Paw. Quant+ au peptide P30 ou les Trp⁴ et Trp⁸ sont mutés en Ala, son activité antipolymérase est 69-fois inférieur à celle de P27. De même, la mutation de ces deux Trp en Phe un autre résidu aromatique (P31), entraîne une nette diminution de cette activité de 27 fois par rapport à P27.

ii) L'activité polymérase ARN-dépendante a aussi été évaluée en présence de ces différents peptides. Les effets obtenues avec les différents peptides, sont identiques à ceux observés sur l'activité ADN-polymérase ADN-dépendante, suggérant que ces peptides agissent indifféremment sur les deux activités de RT et ne présentent aucune sélectivité en fonction de la nature de la matrice ARN ou ADN.

iii) La potentialité des différents peptides à bloquer la réplication viral a aussi été évaluée. Nous avons réalisé des tests antiviraux comparatifs pour les peptides (Tableau 10), en utilisant

l'AZT (qui n'est pas sur le tableau 10) comme inhibiteur de référence pour la RT. Pour cela, des monocytes activés du sang périphérique [Phytohemagglutinin-P (PHA-P)-activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)] préincubés avec des concentrations croissantes des peptides (0.1 à 100nM) sont infectés avec la souche de référence VIH-1 LAI. Les valeurs des EC₅₀, c'est-à-dire les valeurs correspondant à 50% de dose effective des peptides sont calculées selon la formule Kärber (Roisin et al. 2004). L'indice de sélectivité qui correspond au rapport de l'EC₅₀ sur la cytotoxicité (EC₅₀ : dose induisant la mort de 50% des PBMCs non infectés) a aussi été déterminée (Tableau 10).

Peptides	Séquence	Ki _(ADN) μM	Ki _(ARN) μM	EC ₅₀ nM	IS
Paw	GTKWLTEWIPLTAEAEAC	0.7±0.2	0.81±0.1	1.8±0.7	>500
P27	GTKWLTEWIPLTAEC	0.045±0.01	0.053±0.03	0.12±0.05	>5400
P30	GTKALTEAIPLTAEC	3.1±0.2	3.7±0.8	----	ND
P31	GTKFLTEFIPLTAEC	1.2±0.5	1.8±0.7	----	ND

Tableau 10: Caractéristiques des différents peptides inhibiteurs.

Etude comparative de Paw, P27 et des variants (mutés sur les Trp⁴ et Trp⁸), sur l'activité polymérase ADN et ARN dépendante de la RT, la prolifération virale et l'indice de sélectivité IS (--- : En cours d'étude ; ND : non déterminée)

L'activité inhibitrice de P27 avec un EC₅₀ de 0.12 ± 0.05nM est 15 fois supérieure à celle de Paw (EC₅₀ = 1.8 ± 0.7 nM), et de surcroît supérieure à celle de l'AZT (EC₅₀ = 10 ± 5 nM). P27 ne présente pas de toxicité puisque son indice de sélectivité est supérieur à 5400, 10 fois supérieur à ceux de l'AZT et de Paw. Comme dans le cas de Paw, les Trp⁴ et Trp⁸ sont indispensables pour l'inhibition. La mutation de ces deux Trp en Ala (P30) et ou en Phe (P31) supprime complètement l'activité antivirale et diminue radicalement l'activité anti-polymérase de 70 et de 33 fois respectivement. P27 présente donc un important potentiel d'inhibition de la RT en comparaison avec des inhibiteurs utilisés en clinique tels que l'AZT. Dans la suite de ce travail, nous avons étudié le mécanisme d'action du peptide P27 en

comparaison avec Paw et l'efavirenz (EFV), dans le but de mettre en évidence les processus moléculaires impliqués.

II-2 Etude de fixation de P27 sur la RT par la technique de Chromatographie

Dans le but de comprendre le mécanisme d'action du peptide P27, nous avons analysé son mode de fixation sur la RT par chromatographie d'exclusion de taille sur FPLC (matériels et méthode; C.f VI-1). Le chromatogramme à 280 nm montre que la forme hétérodimérique de RT seule est éluée sous la forme d'un simple pic à 8,5 minutes, ce qui valide la qualité de la préparation de la RT qui est à 100% sous forme dimérique (Figure 34A). En suit, le mélange de RT avec d'autres protéines (Albumine, Aldolase) a été pré-incubé avec P27 marqué à la fluorescéine FITC sur le groupement SH de la Cystéine du C-terminal (P27-FITC), puis analyse par chromatographie (Figure 34B). La détection sur deux longueurs d'ondes à 280 nm pour les protéines et à 492 nm pour la sonde FITC fixée sur le peptide, montre que le pic P27 se superpose avec celui de la forme dimérique de RT et donc les deux coéluent ensemble, suggérant que P27 se fixe spécifiquement à la RT et ne présente aucune affinité vis-à-vis des autres protéines. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'affinité de P27, à savoir s'il se fixe spécifiquement à la forme dimérique de RT ou à l'une des sous-unités, c'est-à-dire p51 ou p66. Pour cela P27 a été préincubé avec la RT, ensuite RT a été partiellement dissociée en ajoutant 17% d'acétonitrile (ACN) puis analysée par chromatographie d'exclusion de taille utilisant la colonne Biosep-Sec S3000. Le chromatogramme (Figure 34C) montre que, P27 se fixe uniquement sur RT dimérique et donc, aucune fixation n'est observée sur les sous unités isolées. Nous avons aussi vérifié la dissociation totale de RT en p66 et p51 en présence de 25 - 30% d'ACN (Figure 34D)

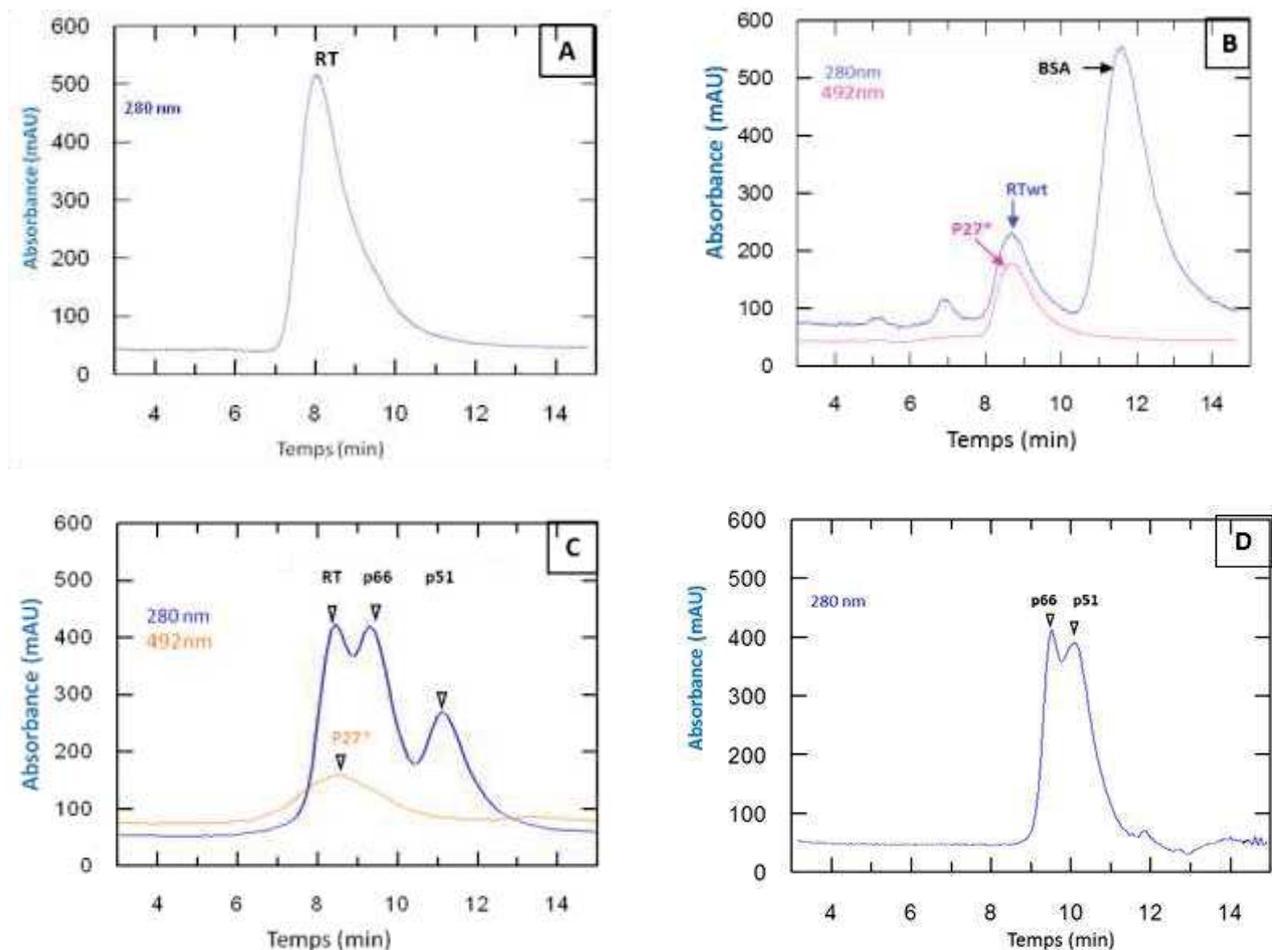


Figure 34 : Etude de la fixation de P27 sur RT par chromatographie d'exclusion de taille sur FPLC

(A) Chromatogramme d'éluion de la RT en absence de peptide. Un seul pic d'éluion à 8.5min est détecté à la longueur d'onde de 280nm; (B) P27-FITC est préincubé avec RT dans un mélange avec l'Aldolase et la BSA comme contrôle. Les protéines sont détectées à 280nm (en bleu) et P27-FITC est détectée à 492nm (en magenta). Coélution de P27 avec la RT; (C) Dissociation partielle de la RT en ces deux sous unités p51 et p66 en présence de P27. La forme dimérique de la RT coélue avec P27. (D) Dissociation complète de RT.

II-3 Etude de fixation de P27 sur la RT par spectroscopie de fluorescence

La fixation et l'affinité de P27 pour RT ont été évaluées par spectroscopie de fluorescence. Nous avons utilisé d'une part la fluorescence extrinsèque du peptide P27-marqué au FITC en C-terminal et d'autre part la fluorescence d'une matrice/amorce (p/t :19/36 mers) marquée au fluorescéine amidite (FAM), un dérivé de la fluorescéine. En effet, la spectroscopie de fluorescence est une méthode de détection rapide non invasive, qui utilise les propriétés spectrales des fluorophores très sensibles à un quelconque changement dans leur environnement (Klonis et al. 1998). Le marquage au FITC du peptide inhibiteur P27 se fait

par réaction entre le groupement thiol de la Cystéine en C-terminal du peptide et l'amine réactive du fluorophore FITC (Fluorescéine isothiocyanate). Nous avons vérifié préalablement que la présence du FITC n'influe pas sur l'activité inhibitrice de P27 et déterminé une constante d'inhibition ($K_i = 57 \pm 5$ nM) du même ordre de grandeur que celle du peptide libre. Dans le but de déterminer l'affinité de P27 par rapport à la RT en présence et en absence du substrat de l'enzyme (amorce/matrice : p/t), une concentration du peptide marqué P27-FITC (200nM) a été titrée par des concentrations croissantes de RT seule ou en complexe avec un p/t.

La fixation de P27 sur la RT se traduit par une augmentation de fluorescence du FITC de 11% en absence de p/t (ADN/ADN : 19/36), et de 60% en présence de p/t, suggérant que P27 se lie à la RT en induisant un important effet conformationnel. Les constantes de dissociation (K_d) relatives de P27 sur la RT, sont calculées en utilisant une équation quadratique. En absence de p/t le K_d est de 77 ± 15 nM, et en présence de p/t le K_d : 33 ± 14 nM. L'affinité de P27 pour la RT augmente donc de 2 fois en présence de p/t (Figure35).

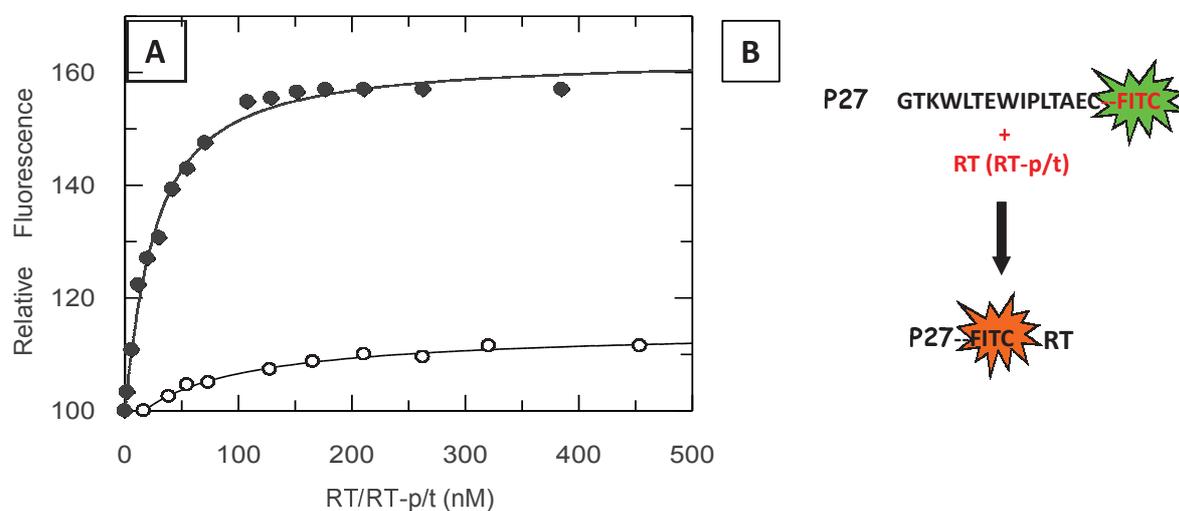


Figure 35: Variations de fluorescence observée pour la fixation de P27 sur RT

(A) Courbes de titration en présence (●) et en absence (○) de l'amorce/matrice p/t
 (B).Schéma Simplifié de cette fixation avec les variations de fluorescences du vert au Rouge.

Nous avons évalué l'affinité de P27 non marqué pour la RT préalablement incubée avec du p/t marqué au FAM (p/t-FAM) par spectroscopie de fluorescence. La fixation de P27 sur la RT induit une augmentation de fluorescence de 35%, avec une constante de dissociation K_d

de 37 ± 12 nM (Figure 36). Le K_d étant dans le même ordre de grandeur que celui de la dissociation du peptide marqué, confirmant que la présence de la sonde FITC sur le peptide n'affecte quasiment pas l'effet de P27 sur la RT.

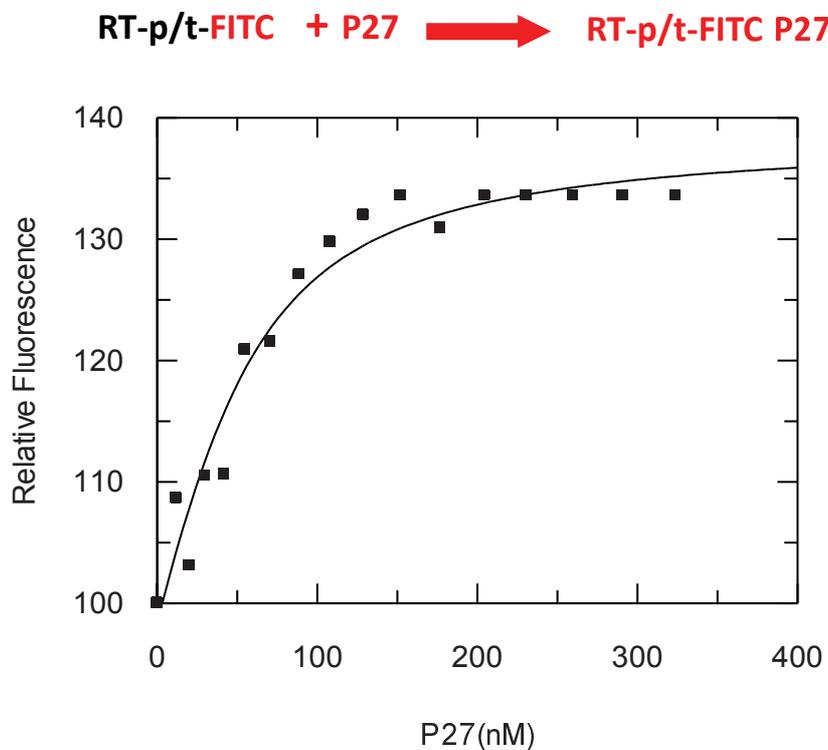


Figure 36 : Variations de fluorescence observée pour la fixation de P27 non marqué (■) sur le complexe RT-p/t

D'un point de vue structural, P27 tout comme Paw (Agopian et al., 2009) se fixe préférentiellement sur RT en présence de p/t et donc plus sur une forme "ouverte" que sur la forme fermée de la RT (Figure 37).

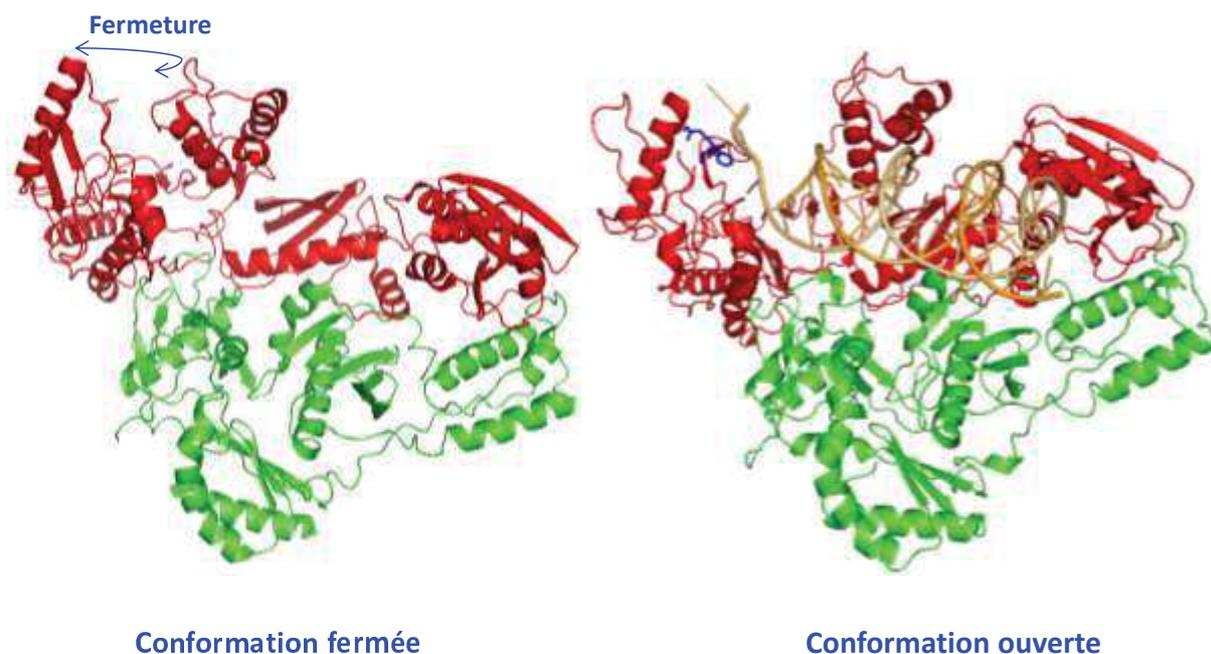


Figure 37: Structure des formes ouverte et fermée de la RT.

La fixation de p/t sur la RT entraîne un changement de conformation et une ouverture thumb/fingers, par rotation du fingers d'un angle de 30 à 41° (Das et al. 2008; Huang et al. 1998).

En comparaison, Paw (Kd : 7.1nM, Agopian et al. 2009) a 3 fois plus d'affinité que P27 pour la RT. La fixation de Paw sur RT entraîne une atténuation de fluorescence (Agopian et al. 2009) tandis que la fixation de P27 induit une augmentation de fluorescence. Cette différence de variation de fluorescence suggère que les peptides bien que présentant une séquence similaire ne se fixent pas dans le même environnement ou sur le même site de RT.

L'utilisation des peptides hautement flexibles limite la possibilité d'obtenir rapidement la structure cristallographique du complexe RT/P27. Dans l'optique, de proposer un site de fixation pour P27, une étude a été faite par "docking" *in silico* du peptide sur RT en utilisant un modèle structural de P27 en solution généré par la méthode de prédiction de structure *ab initio* "Peplook" (Thomas et al. 2009) combinée à de la dynamique moléculaire à l'aide de GROMACS. Deux sites potentiels de fixation ont été identifiés.

- Le site S1 correspondant à la zone de contact entre les domaines "connexion/fingers" de p51/p66
- Le site S2 localisé à l'interface entre les domaines "fingers/thumb" de p66

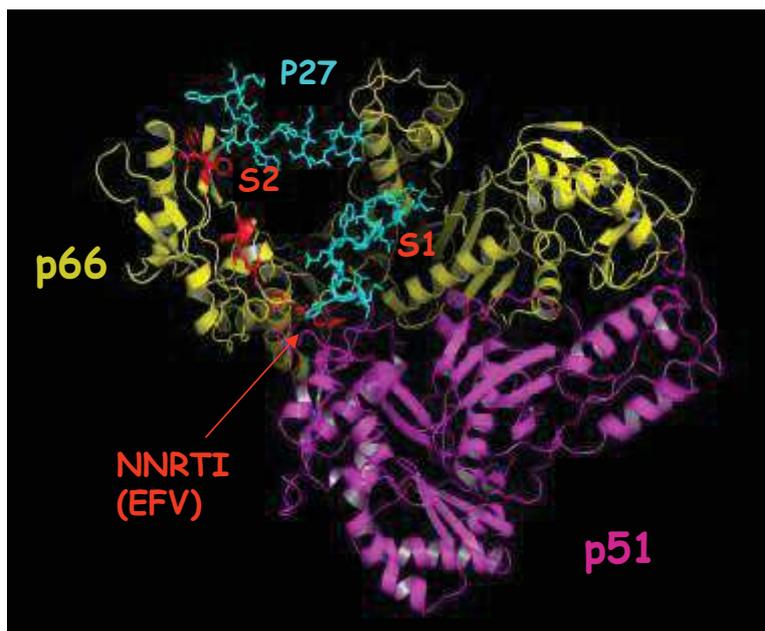


Figure 38 : Modèle de "docking" de P27 sur RT (Pr Brasseur. R CBMN-FSAGx Gembloux, Belgique) Deux sites probables de fixation de P27 (en bleu) sur la sous unité p66 (en jaune) de la RT. En rouge les résidus W^{24} , F^{61} et R^{78} dont la mutation diminue l'affinité de Paw pour la RT

Le site S1 est situé à proximité de la poche de fixation des NNRTIs tel que l'Efavirenz (EFV), tandis que S2 présente une fixation de p27 sur la RT entre les domaines fingers et thumb (Figure 38). La mutation en glycine des résidus W^{24} et F^{61} qui sont mis en évidence en rouge sur le domaine fingers de la sous unité p66 (Figure 38) était précédemment décrite (Agopian et al., 2007) comme affectant l'affinité de Paw pour la RT d'un facteur de 100. Sur la base de ces résultats, nous avons analysé expérimentalement ces hypothèses dans le but de vérifier le site de fixation S1 ou S2 proposé par la modélisation moléculaire.

II-4 Effet de P27 sur la fixation des substrats de RT

Pour mieux comprendre et analyser le mécanisme d'action de P27, nous avons évalué l'impact de P27 sur l'interaction de RT avec ses substrats p/t et dNTP. L'interaction de RT et p/t-FAM puis celle de RT-p/t-FAM et dNTP ont été mesurées par titration de fluorescence à l'équilibre. La présence de P27 dans des concentrations saturantes ($1 \mu\text{M}$) diminue légèrement l'affinité

de p/t marqué pour RT, de $16 \pm 5\text{nM}$ à $28 \pm 6\text{nM}$ (Figure 39). La fixation du p/t sur RT se traduit par une atténuation de fluorescence de 19% en absence de P27, et de 30% en présence de P27, suggérant que la présence de P27 seule affecte l'organisation structurale de la RT, au niveau de l'environnement du 3'terminal de l'amorce situé à proximité du site catalytique de la polymérase.

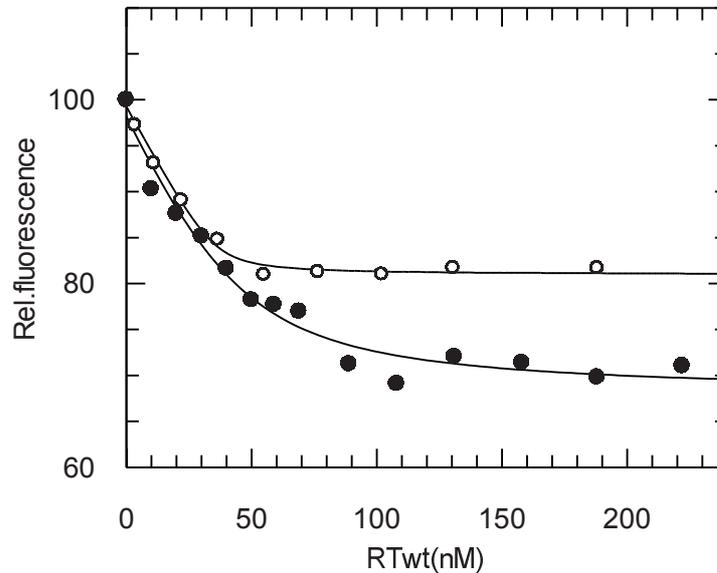


Figure39 : Effet de P27 sur la fixation de la matrice/amorce à RT

Fixation de p/t marqué au FAM sur RT (○) et sur le complexe RT-P27 (●)

Nous avons ensuite analysé le rôle de P27 sur la fixation du dNTP entrant sur la RT. La suivie de titration d'interaction entre la RT pré-incubée avec p/t-FAM (FAM fixé sur le 3'terminal de l'amorce) et le dGTP premier nucléotide complémentaire a été mesurée par spectroscopie de fluorescence à l'équilibre. La fixation du dGTP sur la RT se traduit par une atténuation de fluorescence de 18% et permet de calculer un K_d de $24 \pm 17\text{nM}$ (Figure 40), valeur qui est en accord avec les résultats précédemment décrits (Rittinger et al., 1995 ; Spence et al., 1995). En présence d'une concentration saturante de P27 ($1\mu\text{M}$), l'affinité de RT pour le dGTP est réduite de 62 fois avec une constante de dissociation K_d de $1.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$. Cette réduction dramatique additionnée avec une atténuation considérable de fluorescence de 100 à 50% (Figure 40) montre clairement que la présence de P27 altère la conformation du site de fixation du dNTP et l'organisation structurale du site catalytique de la polymérase.

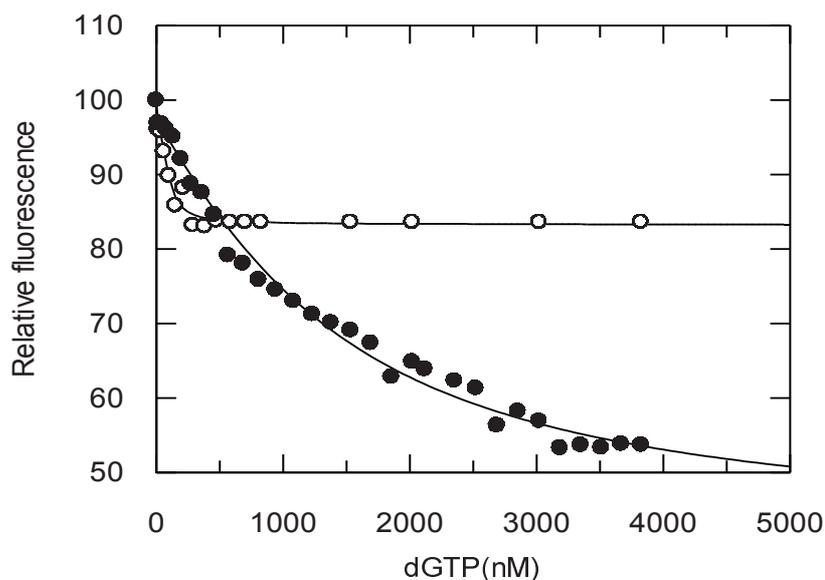


Figure 40 : Effet de P27 sur la fixation de GTP sur RT

Binding de dGTP sur le complexe RT-p/t (○) et sur le même complexe en présence d'un excès de P27 (●).

II-5 Effet de P27 sur la cinétique de polymérase à l'état pré-stationnaire

Nous avons étudié l'implication du peptide P27 sur l'activité polymérase de la RT à l'état pré-stationnaire. Une concentration de 250nM de RT est pré-incubée avec un excès de 8 fois amorce/matrice 25/45, en absence ou en présence de P27 (0.3μM). La réaction est initiée en additionnant $[\gamma^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ (10μM) et du Mg^{2+} (6mM), par la suite, "quenchée" à différents intervalles, avec de l'EDTA, comme décrit précédemment (Agopian et al., 2007). Suite à l'incorporation du dGTP par la RT, nous avons obtenu des constantes de vitesse à l'état stationnaire $K_{ss} = 0.22 \text{ s}^{-1}$ en absence de P27, et $K_{ss} = 0.03 \text{ s}^{-1}$ en présence de P27 (K_{ss} : "steady state") (Figure 41). P27 réduit considérablement la constante de vitesse à l'état stationnaire, qui correspond à la réaction de polymérisation distributive, signifiant la fin de l'élongation de l'amorce/matrice par la RT et la formation d'un nouveau complexe avec un autre p/t pour démarrer une nouvelle polymérisation.

Nous avons ensuite évalué l'effet de P27 sur la fidélité de l'enzyme à incorporer des nucléotides non complémentaires ("mismatch") lors de la synthèse d'ADN. Nous avons déterminé les constantes de vitesse à l'état stationnaire de la RT pour l'incorporation par erreur de dTTP dans le p/t (amorce/matrice) (Figure 41). En contrôle, nous avons démontré et vérifié que la constante de vitesse à l'état stationnaire d'erreur d'incorporation du dTTP est

réduite de 785 fois ($K_{ss}^{Mis} = 0.00028 \text{ s}^{-1}$) par rapport à l'incorporation du bon nucléotide dGTP, résultat qui est en adéquation avec les valeurs de constantes précédemment démontrées (Kati et al. 1992 ; Rittinger et al. 1995). En présence de P27, cette constante de vitesse à l'état stationnaire est réduite à 71 fois ($K_{ss}^{Mis} = 0.0031 \text{ s}^{-1}$), qui est 11 fois moins qu'en absence de l'inhibiteur. Ces résultats confirment le fait que P27 altère la conformation du site de fixation des dNTPs et la présence de P27 diminue la fidélité de RT de pour la fixation de la base complémentaire.

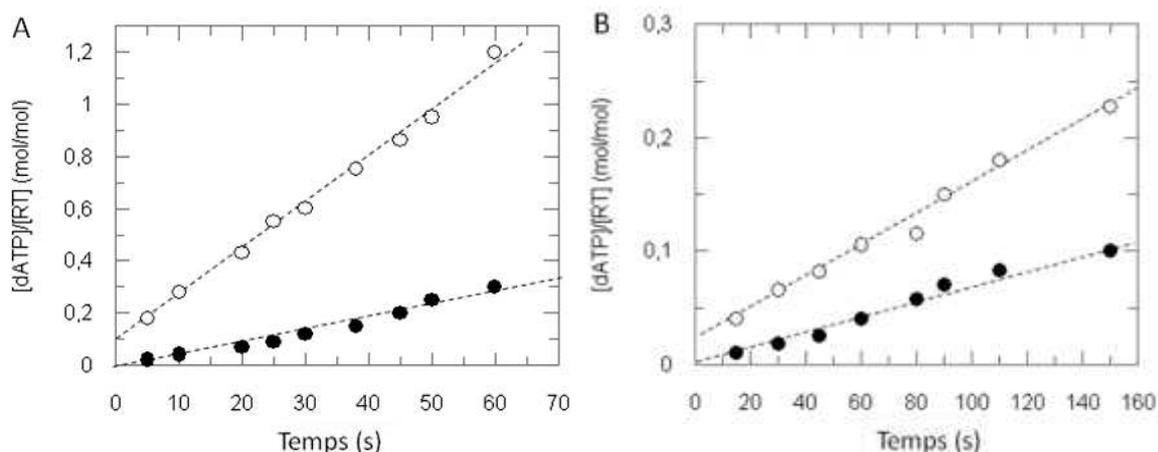


Figure 41 : Cinétiques d'incorporation des dNTP à l'état stationnaire en présence de P27. L'état stationnaire a été mesuré dans du Becher thermostaté en absence (○) et en présence (●) de 300nM de P27. (A) Cinétique à l'état stationnaire de dATP entrant en tant que base complémentaire et en (B) celle de dTTP en tant que base non-complémentaire ("mismatched").

II-6.1 Etude du site S1 : Mécanisme de P27 par rapport à celui des inhibiteurs non nucléosidiques (NNRTIs)

Comme nous l'avons démontré précédemment, le peptide P27 altère la conformation de la forme dimérique de RT. Compte tenu du fait qu'un des sites potentiels de fixation de P27 recouvre celui de certains NNRTIs, nous avons fait une étude comparative P27 par rapport à l'EFV.

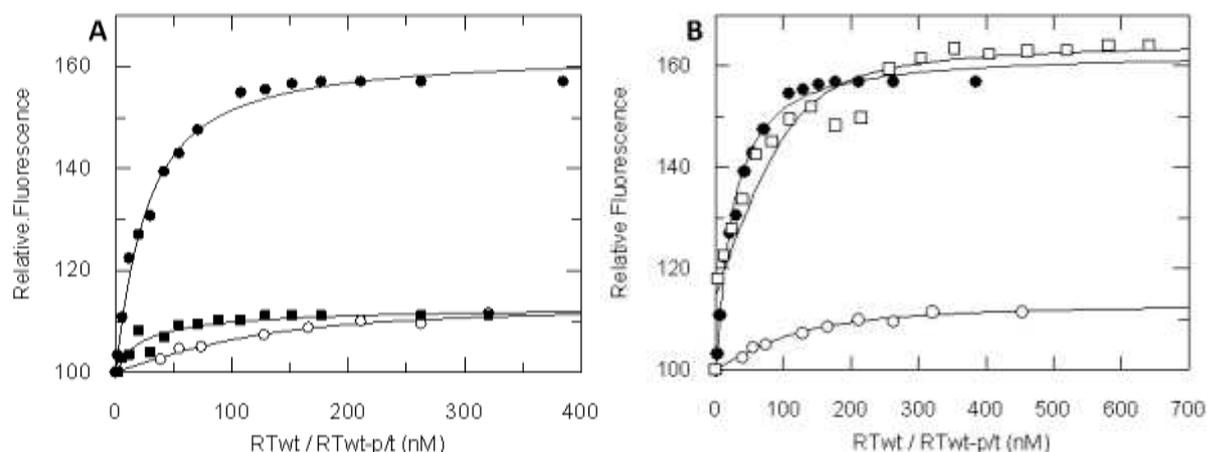


Figure 42 : Effet de l'EFV sur l'affinité de RT pour P27

(A) Fixation de P27 sur RT seule (○), en présence d'EFV (■), et sur le complexe RT-p/t seul (●). (B) Fixation de P27 sur RT seule (○), sur le complexe RT-p/t en absence (●), et en présence d'EFV (□).

La fixation de P27 sur RT seule ou sur le complexe RT-p/t a été évaluée en présence d'un excès d'EFV (1 μM). Les constantes de dissociation déterminées sont de 77 ± 45 nM pour l'interaction (P27 + RT seule) et de 20 ± 6 nM en présence d'EFV (P27 + RT-EFV), cela montre que l'EFV augmente de 3 fois l'affinité de P27 pour la RT. En présence du substrat (p/t), l'interaction de P27 avec le complexe RT-p/t nous donne respectivement les K_d de 33 ± 14 nM (en absence d'EFV) et de 36 ± 9 nM (en présence d'EFV), avec dans les deux d'important variation de fluorescence (respectivement de 55 et 61%). Ces valeurs suggèrent que la présence du p/t altère l'effet de l'EFV et que l'EFV n'empêche pas la fixation de P27 sur la RT (Figure 42). Inversement, d'autres études d'interaction ont montré que l'EFV améliore d'un facteur de 3 l'affinité de la RT pour le p/t (K_d : 6 ± 2 nM) (Figure 43), confirmant les travaux qui ont montré que l'EFV tout comme certains NNRTI, favorise une ouverture partielle de la RT entre les sous domaines fingers et thumb (Mui et al. 1992; K.S.Harris et al. 2005). Alors que la présence de P27 a tendance à réduire de 16 ± 5 nM à 22 ± 6 nM (Figure 43), suggérant P27 et l'EFV se fixent différemment sur RT.

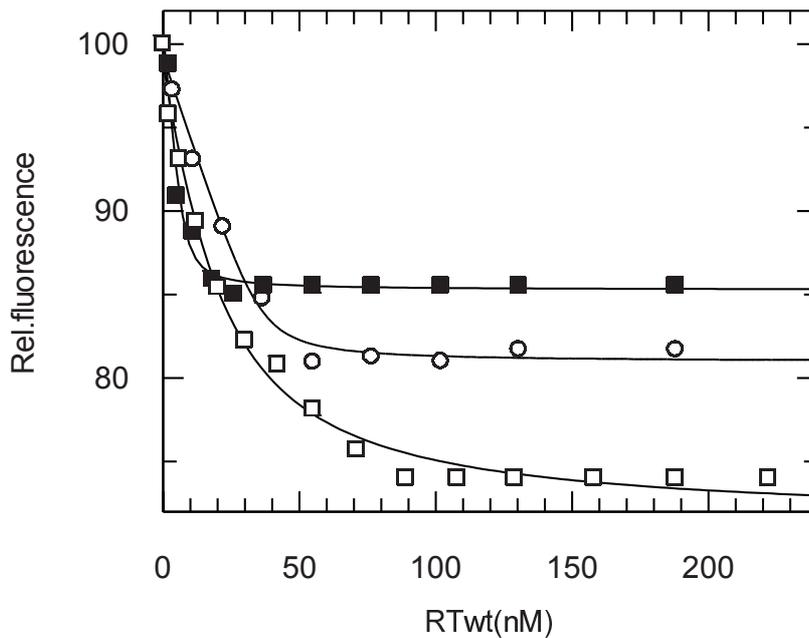


Figure 43 : Effet de P27 et d'EFV sur la fixation de p/t à RT

Fixation de p/t sur RT en absence (○), et en présence d'EFV (■) et sur le complexe RT-P27 (□)

Afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle P27 et EFV ont deux modes de fixation différents, nous avons évalué la fixation de P27 sur des mutants de RT résistants à l'EFV. Nous avons élaboré par mutagenèse dirigée différents mutants apparaissant rapidement dans la résistance aux NNRTIs : K101E, K102N, K103N, et N348I (S.H.Yap et al. 2007; Hachiya et al. 2008; Ren et al.2008; Mellors et al.1992; 1993; Nikolenko et al. 2010). Bien qu'il existe de nombreuses mutations impliquées dans la résistance au NNRTIs, nous avons concentré notre étude aux mutations les plus fréquentes dans la résistance à l'EFV. Les résultats obtenus sont reportés dans le Tableau 11. Le peptide P27 est capable de se fixer à tous les mutants et aucune de ces mutations n'abolit l'interaction de P27 sur RT. Dans le cas du mutant RT^{N348I} l'affinité de P27 est augmentée de 2 fois en présence et en absence de p/t. Dans le cas de tous ces mutants à l'exception de K101E, la présence de P27 diminue l'affinité de RT pour le p/t d'un facteur de 2, comme observé avec la RT^{wt}, suggérant que ces mutations n'affectent pas la fixation de P27 sur RT conformément au RT^{WT} et donc confirmant que les sites de fixation d'EFV et de P27 sur la RT sont différents.

RTs	p/t* Kd (nM)	p/t*(P27) Kd (nM)	P27* Kd (nM)	P27* (p/t) Kd (nM)
RTwt	16 ± 5	22 ± 6	77 ± 45	33 ± 14
K101E	18 ± 2	16 ± 3	90 ± 44	13 ± 2,3
K102N	25 ± 9	39 ± 26	88 ± 2	34 ± 5,6
K103N	31 ± 12	70 ± 27	61 ± 40	*
N348I	55 ± 12	71 ± 28	40 ± 19	16 ± 5

Tableau 11 : Fixation et impact de P27 sur les différents mutants résistants aux NNRTIs

Compte tenu de ces résultats, nous sommes en mesure d'exclure le site S1 comme site de fixation de P27. Dans la suite de ce travail, nous nous sommes focalisés sur le site S2. Le modèle reporté sur la Figure 38 montre deux points de contact entre le peptide et la RT. Le premier contact implique le N-terminal du peptide avec le domaine Fingers de p66. Etant donné que nous sommes déjà en possession des mutants sur les résidus W²⁴ et F⁶¹, nous avons évalué l'implication de ces résidus dans la fixation de P27 sur la RT. Pour le deuxième contact, nous nous sommes aussi basés sur le modèle pour muter en Gly les résidus K259, et L289 sur le domaine thumb qui semblent être en contact avec l'extrémité C-terminal du peptide, mais aussi les résidus I63 et W71 qui sont sur le domaine fingers (Figure 45).

II-6.2 Etude de site de fixation de P27 en comparaison de Paw sur la RT : Le site S2

Comme mentionné précédemment, le Site S2 correspondrait à deux contact entre le peptide et RT, le premier avec le domaine fingers, et le second avec le domaine Thumb. Des travaux précédents de notre équipe (Agopian et al) avaient démontré que les mutations Trp²⁴ et Phe⁶¹ sur le domaine fingers de la sous unité p66 diminuaient considérablement la fixation du peptide Paw. Nous avons évalué l'impact de ces mutations sur P27 (**Figure 44**).

Contrairement à Paw, ces mutations augmentent de 12 fois l'affinité de P27 pour RT (Kd : 2.7 ± 1.5nM) en absence de p/t, alors qu'elles n'affectent pas la fixation de P27 en présence de p/t. L'affinité est quasi identique à celle de RT^{wt} (Kd : 27 ± 6 nM).

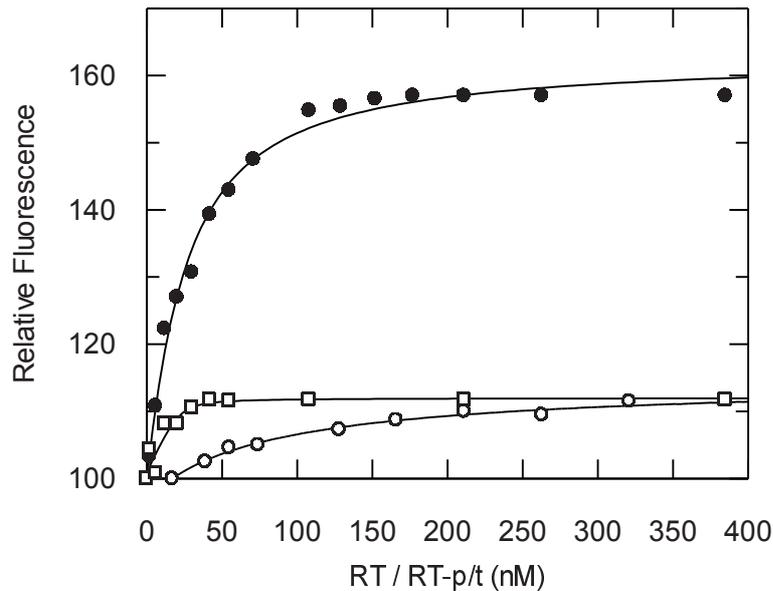


Figure 44: Effet de P27 sur le double mutant RT^{DM}

Fixation de P27 marqué au FITC sur la RT^{wt} (○), sur le double mutant de RT^{DM} (□) et sur le complexe RT^{wt}-p/t (●)

Il a été aussi démontré que les deux mutations entraînent une ouverture partielle de la RT entre thumb/fingers (Agopian et al. 2007), facilitant ainsi la fixation du peptide P27. Ces résultats, nous laissent suggérer que le site de fixation de P27 sur le domaine fingers est différent de celui de Paw. Des travaux en cours devront permettre de vérifier le deuxième point de contact entre P27 et le domaine thumb de la sous unité p66, pour cela, nous nous sommes basés sur le model (figure38) pour élaborer des mutations des résidus K259G et L289G sur thumb (Figure 45). Par ailleurs, nous avons également réalisé des mutations des résidus I63G et W71G dans le but de déterminer le contact avec le domaine fingers (Figure 45).

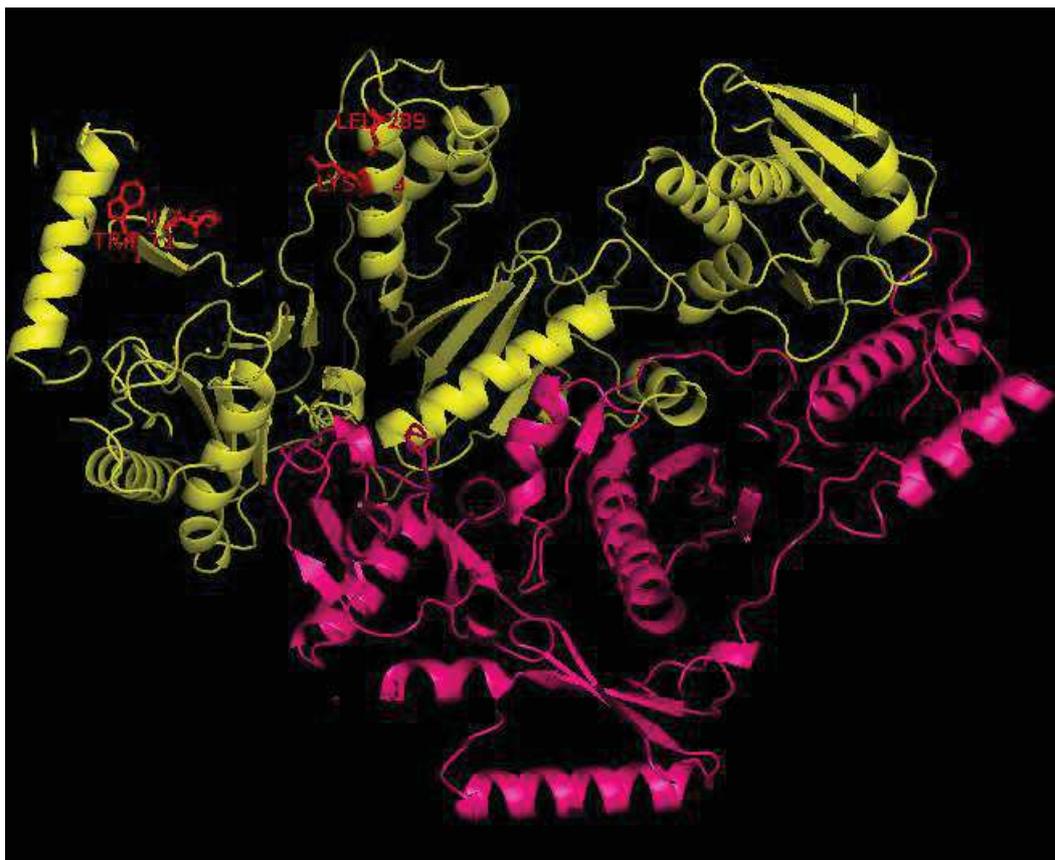


Figure 45 : Etude du site de fixation (S2) par mutation des résidus K259, L289 I63 et W71

III P27 Inhibe la réplication des souches résistantes aux NRTIs et aux NNRTIs

La limitation majeure des traitements anti-VIH actuellement disponibles est la confrontation à une émergence rapide des souches résistantes aux médicaments. Par conséquent, une des conditions préalables à de nouveaux inhibiteurs est qu'ils doivent être actifs sur les souches résistantes. En effet, plusieurs mutations sont sévèrement responsables de résistance aux NRTIs et/ou aux NNRTIs.

Afin de déterminer le potentiel antiviral de P27 sur les souches résistantes de références, c'est-à-dire présentant une résistance aux NRTIs (AZT, ddI/ddC...), aux NNRTIs (EFV, Nevirapine...), ou multi-résistants (NRTI et NNRTI), une évaluation a été réalisée sur des PBMC activées et infectées par différents virus mutants (Tableau 12).

Les résultats reportés dans le Tableau 12, montrent que P27 bloque la réplication de tous ces virus mutants utilisés. En particulier, P27 est très actif dans des concentrations de l'ordre du

nanomolaire sur des virus HIV-1 contenant une mutation simple de résistance telles que HIV-1 74V et 215Y. Cette efficacité de P27 est de 65 fois supérieure à celle de l'AZT. L'effet de P27 est très prononcé sur des souches virales hautement résistantes à la molécule de référence, l'AZT, mais aussi sur des virus contenant des mutations responsables de résistances multiples. L'efficacité de P27 sur des virus comportant simultanément quatre mutations de résistance à l'AZT, est de 100 à 200 fois supérieure. Elle est de 45 à 137 fois sur des souches multi-résistantes.

RT Genotype	Phenotype	P27 EC50 (nM)	AZT EC50 (nM)
HIV-1 LAI		0.12	10
HIV-1 215Y	AZT-resistant	0.31	55
HIV-1 67N, 70R, 215F, 219Q	AZT-resistant	0.19	110
HIV-1 74V	resistant to ddi and ddC	0.4	68
HIV-1 N119/181C	resistant to NNRTIs	0.1	20
HIV-1 102N, 103N		0.8	47
HIV-1 348I, 102N, 103N		1.4	35
HIV-1 41L, 74V, 106A, 215Y	resistant to NRTI & NNRTI	2.9	270
HIV-1 T69G, 108I, 210W, 215Y		0.35	580
HIV-1 62V, 65R, 75L, 100I, 103N, 116Y, 118L, 151M, 184V		1.2	340

Tableau 12 : Activité antivirale du peptide P27 sur différents mutants résistants aux RTIs en comparaison avec l'AZT.

IV Optimisation de P27

Dans ce travail de Thèse, nous sommes partis d'un fragment hautement conservé du domaine "thumb" (séquence 285 à 300) qui constitue un fort inhibiteur de la maturation de la RT (Paw) pour élaborer un peptide court (P27), 15 fois plus efficace en activité anti-polymérase et antivirale. Cette étude a permis de mettre en évidence un motif peptidique minimum le "pattern" (xxxW⁴xxxW⁸xxxxxx) de ces peptides inhibiteurs de la maturation de la RT. Une des limitations dans l'utilisation des peptides en thérapie est liée à leur faible biodisponibilité associée à leur exposition à la dégradation par des protéases ou par d'autres facteurs

chimiques. L'optimisation de peptides en vue d'applications thérapeutiques peut consister en l'utilisation d'acides aminés non naturels ou de série D, mais aussi en la modification de la structure du peptide soit par cyclisation afin de bloquer les extrémités N et C-terminales, soit par "stappling" afin de maintenir une structure active pontée et non dégradable (Cui HK et al. 2013). Dans ce but, nous avons modifié et cyclisé P27 (Figure 46) afin de lui octroyer une meilleure stabilité et de le protéger contre une éventuelle dégradation.



Figure 46 : Cyclisation de P27 par l'établissement d'un pont disulfure entre les deux cystéines en N et C-terminal.

IV.1 Conception et synthèse chimique de P27 Cyclique

Afin de cycliser P27, le peptide est synthétisé, dans un premier temps, avec une Cystéine supplémentaire en son N-terminal et en enlevant la Lys³ pour conserver le même nombre de résidus (15) que P27 linéaire selon la méthode "Fmoc" décrite dans les matériels et méthodes.

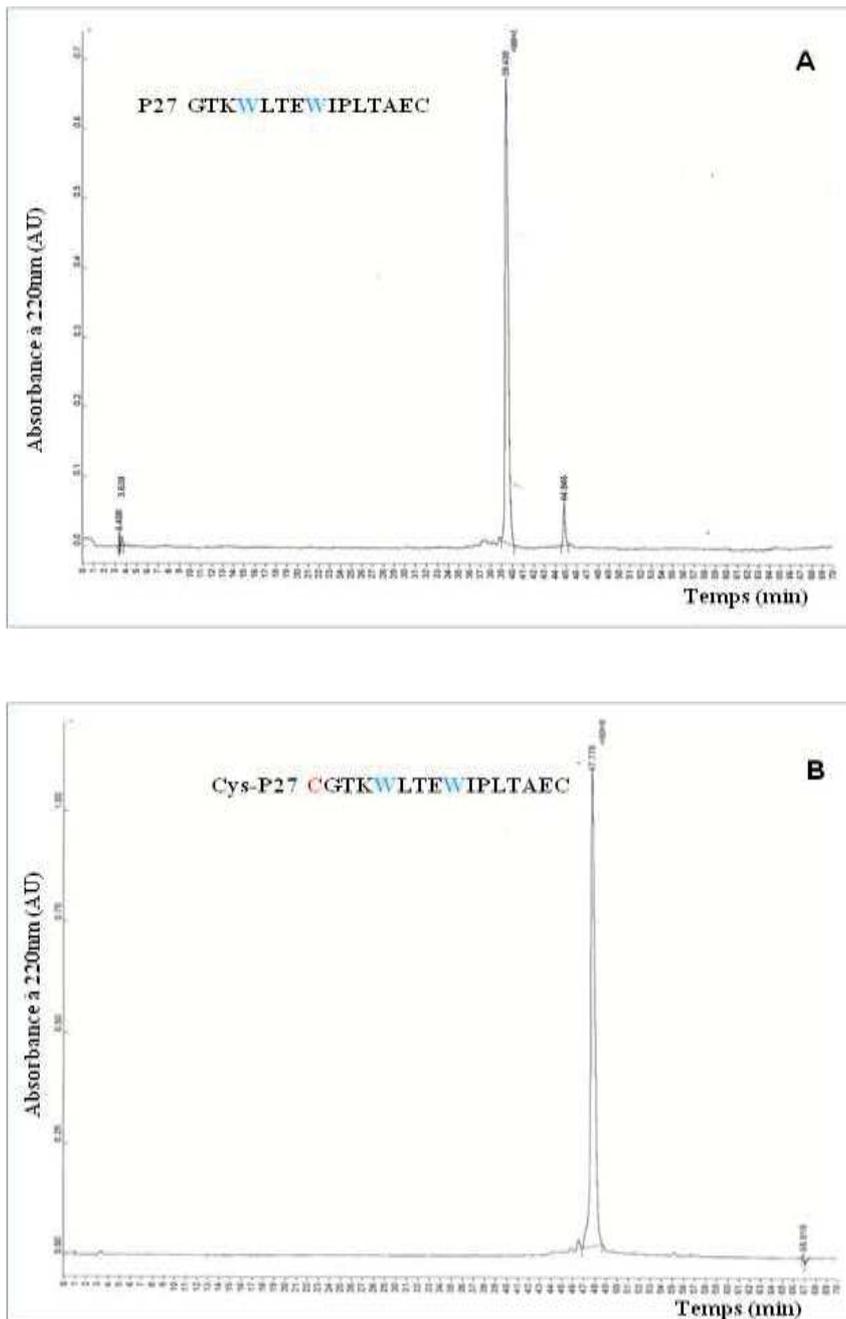


Figure 47: Purification de P27 et Cys-P27 par chromatographie d'exclusion de taille en HPLC

A/ Chromatogramme de purification de P27; B/ Chromatogramme de purification de Cys-P27

Dans un second temps, ce peptide est purifié par chromatographie d'exclusion de taille en HPLC sur une colonne C18 (de chez BioRad) (Figure 47). Ensuite cette purification de peptide est vérifiée en spectroscopie de masse (Figure 48).

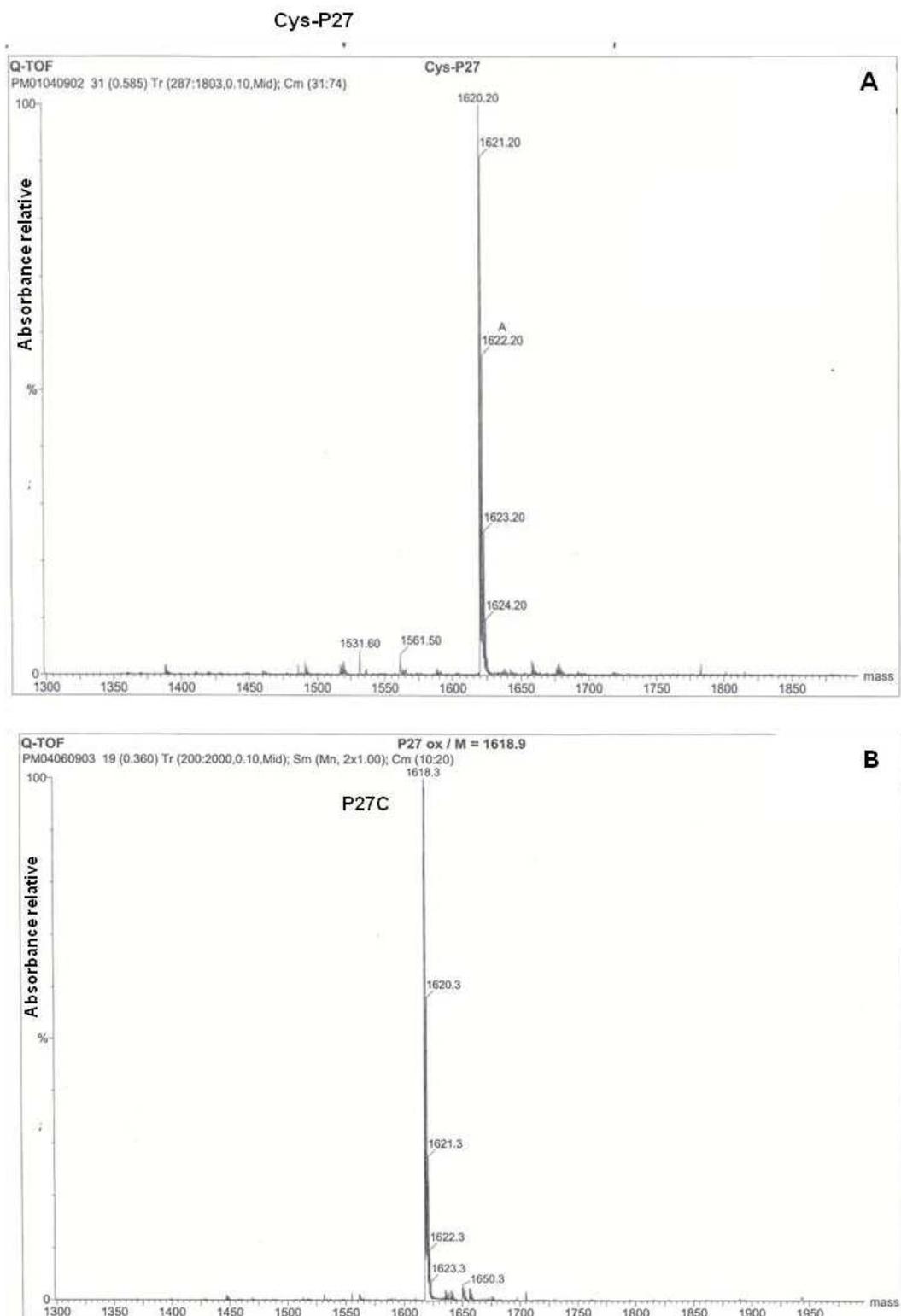


Figure 48 : Analyse de Cys-P27 et P27C par spectroscopie de masse

Vérification de la masse molaire des peptides (A) Cys-P27 qui présente un pic à 1620,20g.M⁻¹ et (B) P27C qui a une masse molaire de 1618,9g.M⁻¹.

Enfin le nouveau peptide P27 est cyclisé par oxydation des groupements -SH de deux Cystéines en N et C-terminal qui vont former un pont disulfure, puis vérifié en présence de Cys-P27 linéaire comme contrôle par chromatographie d'exclusion de taille sur HPLC (Figure 49).

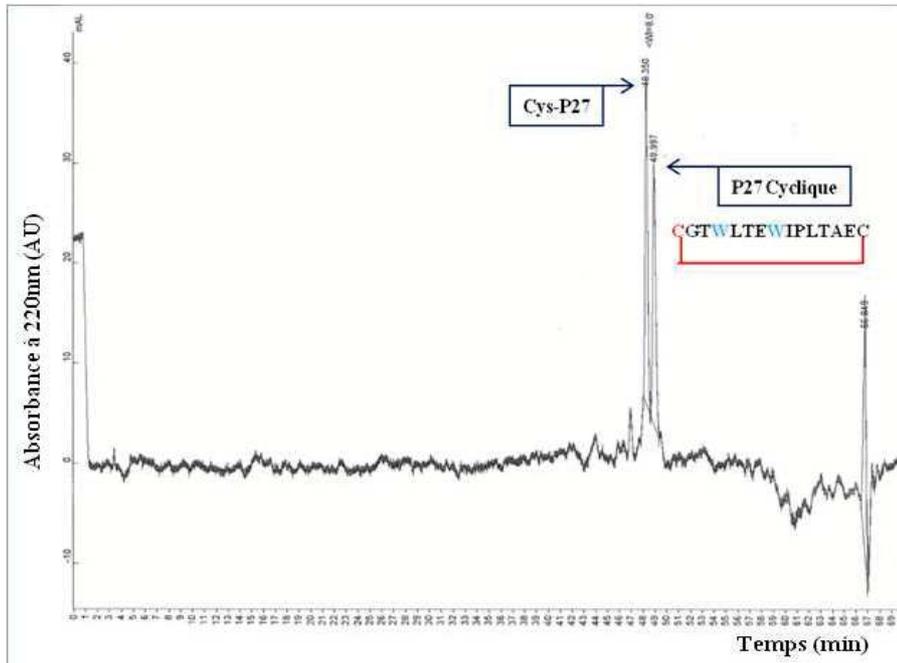


Figure 49 : Profil de co-injection de Cys-P27 et P27 Cyclique.

IV-2 Etude structurale de P27 Cyclique

La cyclisation du peptide P27 peut entraîner une modification conformationnelle du peptide et donc induire un changement de structure aux conséquences positives ou négatives pour l'activité inhibitrice du peptide. Par conséquent, il est nécessaire d'étudier l'état structural de ce peptide cyclisé en comparant sa conformation par rapport à celle de P27 linéaire initial. Cette analyse structurale a été réalisée par étude spectrale en Dichroïsme Circulaire (CD) (Figure 50)

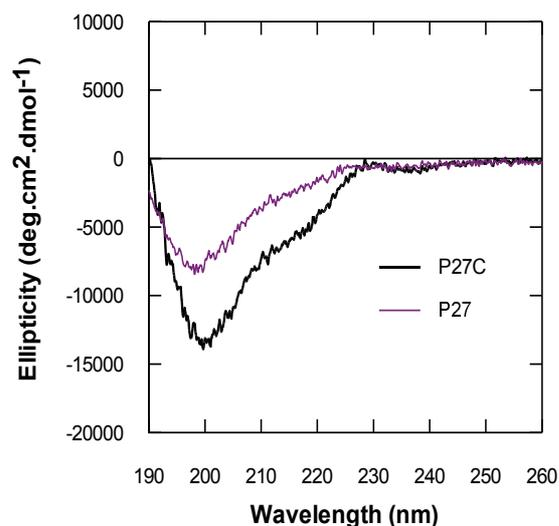


Figure 50 : Spectre de dichroïsme circulaire du peptide P27 en solution d'eau milliQ

En noir violet de P27 linéaire et en noir le spectre de la forme Cyclique de P27 (P27C)

Les spectres CD présentent un profil composé d'un maximum à 190 nm, un minimum à 200 nm et pour P27C (la courbe en noir) un épaulement à 220nm, caractéristique d'une structure en hélice α . Selon l'environnement, P27C peut se structurer d'avantage en hélice α et c'est ce qui est notamment observé en présence d'un pourcentage croissant (33% à 50%) de Tri-fluoro-Ethanol (TFE) ayant la propriété de contraindre une séquence peptidique versatile en hélice α (Figure 51A). Concernant la forme linéaire de P27, les spectres CD révèlent que le peptide ne présente qu'une très faible tendance à adopter une structure en hélice α , même en présence de 50% de TFE (Figure 51B).

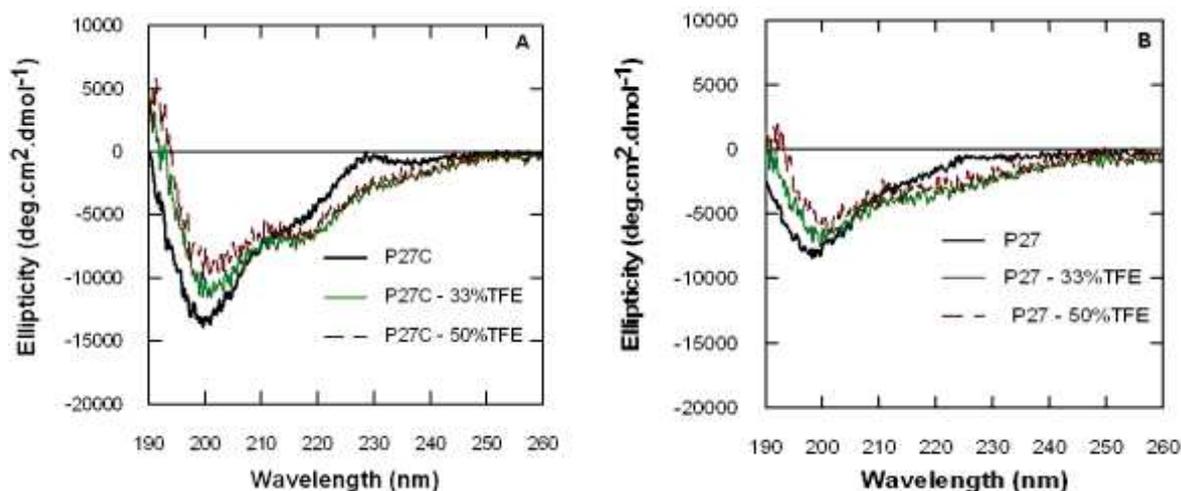


Figure 51 : Versatilité de P27 cyclique par rapport à P27 Linéaire

A/ Spectres CD de P27C seul (en noir), ou en présence de 33% TFE (en marron) et 50% de TFE (en vert). B/ Spectres CD de P27 linéaire seul (en noir), ou en présence de 33% TFE (en marron) et 50% de TFE (en vert)

L'augmentation du pourcentage de TFE dans la solution entraîne une accentuation de l'épaule du spectre CD à 220 nm pour P27C (courbe en marron) (Figure 51B), qui est plus prononcée pour P27C que pour P27.

La cyclisation stabilise davantage la structure du peptide dans une conformation hélicoïdale.

IV-3 Evaluation de l'activité anti-polymérase et antivirale de P27 Cyclique (P27C)

Une fois cyclisé, nous avons entrepris une caractérisation fine de ce peptide en comparaison avec le peptide linéaire. Les mesures d'activité anti-polymérase ($K_i = 50 \pm 7 \text{ nM}$) et l'indice de sélectivité (IS : 6200) sont conformes à ceux du peptide linéaire, à l'exception de l'activité antivirale ($EC_{50} 19 \pm 5 \text{ nM}$).

IV-4 Etude du mécanisme d'action de P27 Cyclique

L'effet du peptide P27 Cyclique sur la fixation du p/t-FAM à la RT a été évalué par spectroscopie de fluorescence. Nous avons réalisé des titrations de fluorescence à l'équilibre, une concentration fixe de p/t-FAM (50nM) a été titrée par des concentrations variables de

RT^{wt} et RT mutants résistants aux RTIs (5nM à 1μM) préalablement pré incubées avec un excès de P27 Cyclique.

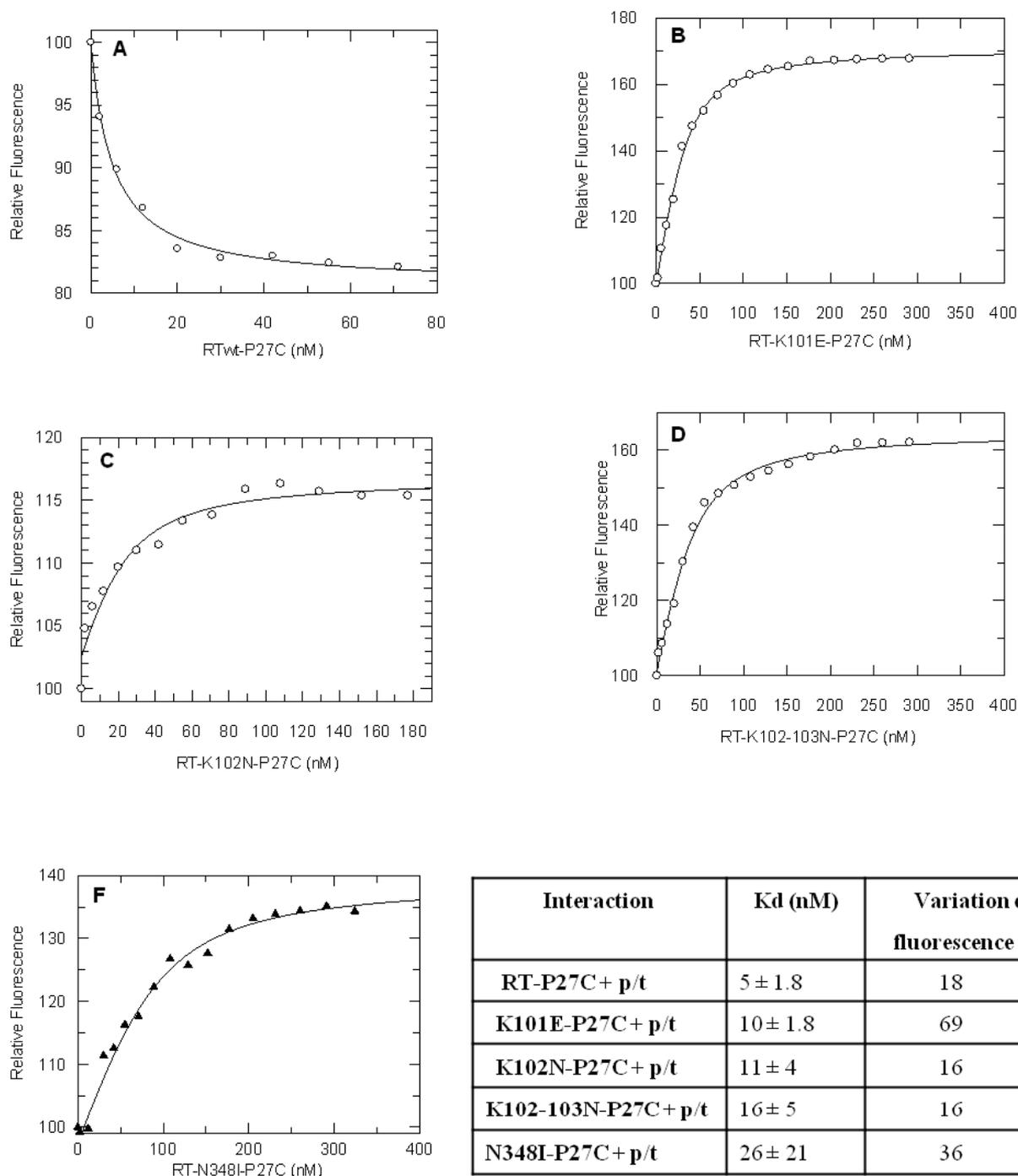


Figure 52 : Effet de P27 Cyclique (P27C) sur la fixation de p/t-FAM sur les différents mutants résistants : (A) wt, (B) k101E, (C) K102N, (D) K102-103N, (F) N348I

Tableau 13 : Effet de P27C sur le binding de p/t à RT

La fixation de p/t sur RT^{wt} en présence de P27C se traduit par un "quenching" ou atténuation de fluorescence du FAM, alors que dans le cas des RT mutants l'on observe une augmentation de fluorescence, signifiant que ces différentes mutations entraînent un réarrangement conformationnel à proximité du site catalytique de la polymérase. De plus, comme P27 linéaire, la présence de P27C augmente considérablement la variation de fluorescence d'un facteur 1,5 lors de cette fixation du p/t sur RT, suggérant qu'un effet conformationnel important s'opère dans l'environnement du 3' de l'amorce marquée au FAM, induit par la présence du peptide linéaire ou cyclique.

A la différence du peptide linéaire, l'affinité de RT est améliorée de 2 à 3 fois pour la RT^{wt} et pour les mutants de RT, à l'exception du mutant (N348I) où l'affinité reste inchangée en présence ou absence du P27C (Tableau 13, Figure 52). Dans ces travaux préliminaires notamment nos études structurales en dichroïsme circulaire (CD), montrent que la forme Cyclique de P27 est plus structurée que la forme linéaire (Figure 51). Ce qui laisse suggérer que la cyclisation du peptide lui confère plus de stabilité structurale, et pourrait expliquer l'amélioration de l'affinité du p/t pour la RT (Figure 52).

V Discussion

La stratégie d'utilisation d'inhibiteur peptidique basée sur le ciblage de la dynamique structurale à l'interface protéine/protéine de la RT nous a permis de développer des peptides inhibiteurs très actifs contre la RT^{wt} et les mutants résistants aux traitements actuellement utilisés en clinique. Le domaine thumb de la RT joue un rôle prépondérant dans le mécanisme catalytique et dans le maintien de l'intégrité de la forme dimérique de RT, ce qui en fait une cible potentielle pour l'élaboration de nouveaux inhibiteurs spécifiques. En effet, le domaine thumb de p66 est impliqué dans la fixation et le placement du p/t dans le site catalytique de l'activité polymérase, tandis que le domaine thumb de p51 forme des interactions fortes avec le RNase-H de p66, qui sont associées à la maturation de la RT dimérique (Rittinger et al. 1995). En particulier, il a été démontré que la séquence du fragment comprise entre les résidus 285 à 300 du domaine thumb de la sous unité p51 joue un rôle important dans la maturation de la RT et qu'elle est très impliquée dans l'interaction avec le domaine RNase-H (Divita et al. 1995). C'est pourquoi il a été proposé que ce fragment pouvait constituer une matrice pour l'élaboration d'inhibiteur de la maturation, Le premier peptide synthétique issu de cette séquence est Pep-A), il inhibe sélectivement l'activation de la RT-VIH-1 (Morris et al. 1999).

L'optimisation de Pep-A en Paw (Agopian et al.2009) a permis d'obtenir un peptide capable de bloquer l'activation de RT et présentant un fort potentiel antiviral. Dans ce travail, nous avons identifié le peptide P27, correspondant à une forme de Paw réduite de deux résidus en son C-terminal. Ce peptide inhibiteur P27 a fait l'objet de la deuxième partie de cette thèse. Ce peptide présente une activité antipolymérase et antivirale de 10 à 15 fois plus efficace que le peptide Paw. Le peptide P27 inhibe l'activité polymérase ADN et ARN dépendantes, sans affecte l'activité RNase-H de la RT. Nous avons montré par la technique de chromatographie d'exclusion de taille sur FPLC, que P27 est bien spécifique à RT et non aux autres protéines (Aldolase, BSA) (Figure 34B). Or, certains NRTIs sont capables d'agir sur la polymérase mitochondriale γ et d'induire une toxicité, d'où une première différence avec P27 d'un point de vue spécificité et mécanisme. Aussi, nous avons montré que P27 se fixe préférentiellement à l'hétérodimère de RT plutôt qu'à l'un des monomères p66 et p51 (Figure 34C), suggérant que P27 tous comme Paw, a besoin de la structure dimérique de RT, pour interagir convenablement.

Par contre, l'ensemble de nos résultats, suggère que le site de fixation et le mécanisme d'action de P27 sont partiellement différents de ceux de Paw. En effet il a été démontré que la mutation de deux résidus W²⁴ et F⁶¹ en G affecte dramatiquement l'affinité de Paw pour RT, contrairement au cas P27 où cette mutation améliore considérablement (d'un facteur de 10) l'affinité du peptide pour RT (d'un Kd de 24±14 nM à un Kd de 2.8±1.6 nM).

Il a été également démontré que la mutation de ces deux résidus favorise l'ouverture partielle de la RT entre les deux domaines impliqués de la p66 (fingers et thumb), puisque W²⁴, F⁶¹ ainsi que R⁷⁸ sont requis dans la stabilisation de la forme fermée de RT (Agopian et al.2007). Ce qui pourrait expliquer nos résultats qui montrent que P27 a plus d'affinité pour la forme ouverte de la RT (Kd : 33±14 nM) que pour la forme fermée lors que l'enzyme est seule sans substrat p/t (Kd : 77±15 nM). Bien que le mécanisme d'action de Paw et de P27 semblent être différents, il n'est guère surprenant que ces deux peptides partagent le même site de fixation en leur N terminal, d'autant plus que P27 est la délétion de deux acides aminés en C-terminal de Paw.

Le peptide P27 tout comme Paw interagit avec le dimère de RT afin de bloquer la maturation de l'enzyme en une forme active. Or, la plupart des NNRTIs se fixent aussi sur la RT dans une poche communément appelée NNIBP (NNRTI Binding Pocket) et bloque l'enzyme dans une conformation non processive. Etant donné que P27 est un inhibiteur conformationnel comme les NNRTIs, nos études comparatives de P27 avec l'EFV montrent clairement que la présence de l'EFV n'empêche pas la fixation de P27 sur RT, au contraire, il

la favorise en maintenant une forme partiellement ouverte de RT, suggérant que les deux inhibiteurs ne sont pas antagonistes. Dans le but de confirmer l'hypothèse selon laquelle P27 n'est pas un NNRTI classique, nous avons évalué l'impact de P27 sur des RTs présentant les mutations de résistance qui apparaissent lors de l'utilisation des NNRTIs. Des travaux ont démontré que l'utilisation des NNRTIs tels que l'EFV, la Nevirapine (Janssen et al. 2005; Azijn et al.2010), ou même récemment la TMC125 et la TMC278 (Eric B et al.2010), conduit à l'apparition d'une ou de plusieurs mutations (Principalement K100I, K101E, K102, 103N, Y181C, Y182C, N348I ...) dans la NNIBP, mais aussi dans l'environnement de celle-ci. En effet ces différents résidus sont impliqués dans le maintien de la bonne configuration structurale de la poche NNIBP et leur différentes chaînes latérales stabilisent aussi les NNRTIs à travers des liaisons hydrogènes, et de Van der Waals (Ming-tain et al.2010). Nos études ont montrés que P27 est actif sur ces différents mutants de la même manière que sur la RT sauvage, suggérant que le site de fixation de P27 ainsi que son mécanisme d'action est différent de ceux des NNRTIs.

Par ailleurs, la fixation de P27 sur la RT semble affecter la structure du site de fixation de l'amorce, ce qui peut être dû soit à un contact direct entre le site de liaison de p/t, et plus précisément avec le motif de "primer grip" de RT, soit à un changement conformationnel induit indirectement par la liaison de P27 à RT. En effet, la présence de P27 perturbe d'une part la fixation de p/t sur RT d'un facteur de 2, et d'autre part de façon dramatique la liaison de dNTP à la RT est altérée de 62 fois. La corrélation de toutes ces données soutient l'hypothèse selon laquelle P27 pourrait directement affecter l'organisation structurale du site catalytique de la RT et altérer le placement correct et la fixation proprement dite du p/t et du dNTP, et donc déstabiliser l'organisation du "primer grip" de la polymérase.

L'évaluation de P27 sur des cellules PBMCs infectées avec différentes souches du VIH-1 a révélé que ce peptide est un inhibiteur potentiel puissant de la RT et bloque très efficacement la réplication virale de 15 fois plus que ne le fait le peptide parent Paw. Néanmoins, les mesures de l'activité antivirale ne sont rendues possibles qu'après avoir utilisé le peptide vecteur Pep-1 pour transporter P27 dans la cellule. De plus, d'une part Pep-1 n'a aucune activité antivirale, et d'autre part il n'interfère pas avec P27 dans son activité anti-polymérase. Les doses de p27 utilisées pour inhiber la réplication virale ($EC_{50} = 0.12 \text{ nM}$) sont 100 à 500 fois inférieures à celles de l'AZT ou de l'EFV qui sont respectivement les NRTI et NNRTI de référence, en plus, P27 inhibe efficacement les différentes souches virales résistantes aux traitements actuellement utilisés avec un fort indice de sélectivité ($IS > 5400$). Après 12 mois de pression sélective pour favoriser l'apparition de mutation de résistance

contre P27, aucun résistant n'a été observé actuellement, suggérant que P27 peut palier aux problèmes de résistance et de toxicité liés à l'administration des NRTIs et NNRTIs, et que P27 pourrait donc compléter les combinaisons des différents médicaments utilisés en HAART.

Le ciblage des changements conformationnels de la forme hétérodimérique inactive de RT aboutissant à la forme active fourni un nouveau concept d'élaboration des molécules peptidiques actives sur les virus et permet ainsi de palier à l'émergence des mutants résistants aux inhibiteurs actuellement utilisés. L'activation de la RT nécessite un processus en deux étapes, la dimérisation qui consiste en l'association rapide des deux monomères résultant en un hétérodimère intermédiaire inactif, suivie par une maturation lente aboutissant à la forme biologiquement active de l'enzyme (Restle et al. 1990 ; Divita et al. 1995). De ce fait, la Reverse Transcriptase constitue un hétérodimère extrêmement stable (Becerra et al. 1991 ; Divita et al. 1995 ; Tachedjian et al. 2001). Sélectionner des molécules qui sont capables de dissocier ce complexe a été un grand challenge d'un point de vue énergétique. Par contre, comme la maturation de la RT nécessite une moindre énergie en comparaison de la dissociation, le ciblage de cette étape, c'est-à-dire le changement de conformation, constitue une approche très attractive pour l'élaboration et le développement de nouveaux composés antiviraux. Dans ces travaux, nous avons mis en évidence le peptide leader P27 capable d'inhiber efficacement la RT et par conséquent de bloquer la réplication et la prolifération virale.

Conclusion/perspectives

Malgré la découverte des différentes molécules présentant une activité anti-VIH chez les malades du SIDA, aucun de ces médicaments à ce jour ne permet l'éradication totale du virus. Leur utilisation en monothérapie est restreinte par une activité éphémère due à l'émergence rapide de mutations de résistance en plus du développement d'effets secondaires liés à la toxicité. Et comme il est recommandé par l'OMS dans la ligne directrice du traitement de l'infection par le VIH, l'utilisation simultanée d'au moins 3 molécules, combinées dans le dispositif "Highly Active AntiRetroviral Therapy" (HAART), a permis une avancée considérable dans le traitement du SIDA. Ce dispositif consiste à utiliser deux à plusieurs molécules anti-RT avec une molécule anti-protéase. En dépit de son efficacité, le HAART n'empêche guère l'apparition des souches virales VIH multi-résistantes. C'est dans cette réalité dramatique que s'inscrit l'urgence de développer de nouveaux agents thérapeutiques qui seront capables d'inhiber la réplication virale de VIH en utilisant des mécanismes d'action ciblant spécifiquement des protéines clés du virus.

Nous avons mis au point une nouvelle stratégie pour surmonter l'avantage du virus à muter rapidement et échapper au médicament, cette stratégie consiste à cibler le déroulement biologique des fonctions principales de la reverse transcriptase. Dans cette optique, nous avons développé de nouveaux inhibiteurs peptidiques de la RT, capables de bloquer fortement l'activité polymérase et donc la réplication virale.

Au cours de cette Thèse nous avons mené des travaux qui ont permis de déterminer le mécanisme d'action de deux inhibiteurs peptidiques de la RT, les peptides P_{ID4} et P27, ciblant respectivement l'étape de la "dimérisation" et l'étape de la "maturation" de RT. L'étude de leur mécanisme d'inhibition a été réalisée en associant des approches biophysique, biochimique et cellulaire.

Dans un premier temps, nous avons optimisé un peptide de 10 acides aminés inhibiteur de l'étape de "dimérisation" de RT, le peptide P_{ID4} , ciblant le cluster des résidus aromatiques à l'interface des sous domaines de connexion des deux sous unités p51/p66 pour déstabiliser le dimère. L'étude d'affinité de P_{ID4} pour la RT a été réalisée en comparaison avec le peptide initial Pep-7, mais aussi en combinant les données du "docking" de Pep-7 sur RT. Et cette étude a démontré que la mutation des résidus impliqués dans la poche de fixation de Pep-7 sur la sous unité p51 n'affecte pas le binding de P_{ID4} sur RT, suggérant que P_{ID4} a un site de fixation différent de Pep-7 ou que l'interaction entre la RT et P_{ID4} implique d'autres résidus. Le criblage des variants de Pep-7 nous a permis de mettre évidence les résidus indispensables au potentiel inhibiteur de ces peptides et de définir clairement un motif de séquence d'acides

aminés responsable de l'inhibition de l'étape de "dimérisation". Dans ces travaux, nous avons également montré que P_{ID4} est un puissant inhibiteur de différents sous-types de souches de VIH-1 de sources géographiques différentes, et bloque la prolifération virale des souches conférant une résistance aux inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques (NRTIs et NNRTIs) actuellement utilisés en clinique. L'efficacité de P_{ID4} à interférer dans la dimérisation des sous unités p51 et p66 est due au fait que P_{ID4} cible une région hautement conservée de la RT. L'analyse structurale de cette région a démontré que la mutation des résidus impliqués dans l'interaction RT/Pep-7 pourrait entraîner la dissociation de l'hétérodimère RT et serait donc létale au virus. Ceci expliquerait alors la conservation de ces résidus dans différents sous types du VIH-1, et donc pourrait expliquer leur sensibilité à Pep-7 et P_{ID4}.

Compte tenu du fait que l'étape de "maturation" de la RT est indispensable à l'obtention de la forme active de la RT, la deuxième partie de ce travail de thèse a consisté en l'étude du mécanisme moléculaire du peptide P27 ciblant l'étape de la "maturation". En effet grâce aux analyses réalisées à l'aide de la chromatographie d'exclusion de taille sur FPLC, nous avons démontré que ce peptide présente plus d'affinité pour la forme dimérique de la RT que pour les monomères, suggérant que P27 cible effectivement l'étape de maturation et que par conséquent son mécanisme d'action diffère de celui des peptides inhibiteurs de l'étape de dimérisation comme P_{ID4}. Nous avons aussi montré que P27 a plus d'affinité pour le complexe RT-p/t que pour la RT seule suggérant que ce peptide affecterait la dynamique des deux sous domaines fingers et thumb de la sous unité p66, qui se ferment et s'ouvrent respectivement en absence et en présence de p/t. En effet pour que ces deux sous unités acquièrent leur flexibilité et leur mobilité, il est nécessaire qu'elles soient correctement dans la bonne conformation structurale, cette structure n'étant possible que par l'association de p51 à p66 (Huang et al 1998). De plus, le modèle de docking de P27 sur la RT proposé par l'équipe du Professeur Brasseur CBMN-FSAGx Gembloux, Belgique avec les études d'affinité en spectroscopie de fluorescence et chromatographie d'exclusion de taille ont permis de renforcer et de valider l'hypothèse selon laquelle P27 cible spécifiquement l'étape de maturation.

Bien que le mécanisme d'action de P27 semble être proche de celui du peptide initial Paw les résultats expérimentaux de fixation de P27 sur la RT mutée au niveau de certains résidus sont complètement opposés à ceux obtenus avec Paw. En effet, il a été démontré que la mutation de W24 et de F61 sur le domaine fingers de la p66 diminue dramatiquement l'affinité de Paw alors que cette mutation n'empêche pas la fixation de P27. Cette différence

d'interaction entre P27 et *Paw* vis à vis de la RT pourrait alors être due à la différence de taille entre les deux peptides puisque P27 correspond à une version raccourcie de deux résidus en C-terminal de *Paw*.

Etant donné que l'étude de fixation de P27 sur RT par spectroscopie de fluorescence a montré que P27 induit d'importants effets au niveau de la dynamique structurale, nous avons proposé que P27 agisse en tant qu'inhibiteur conformationnel. Sur la base de nos résultats nous avons aussi montré que P27 se fixe aisément sur des mutants impliqués dans la résistance aux NNRTIs, sans qu'il n'y ait d'effet antagoniste notamment entre l'EFV et P27, suggérant que P27 n'affecte pas la poche de fixation des NNRTIs. P27 perturbe considérablement la fixation du dNTP entrant (Figure41), ce qui permet de suggérer que P27 déstabiliserait le site du dNTP entrant de la polymérase. Enfin les tests antiviraux que nous avons réalisés en comparant P27 et l'AZT, molécule leader utilisée en clinique dans le ciblage de RT, révèlent que l'efficacité de P27 est de l'ordre du subnanomolaire tandis que celle de l'AZT est de l'ordre de dizaine de nanomolaire (Tableau12). D'autre part, ces résultats (Tableau12) montrent que P27 bloque la réplication des souches résistantes au NRTIs et NNRTIs avec un fort indice de sélectivité supérieur à 5400 et que par conséquent P27 n'est pas toxique.

Le ciblage de RT par les inhibiteurs peptidiques présentés dans cette thèse peut servir de travail pour la mise en place des nouvelles molécules anti-VIH et faire évoluer le concept selon lequel pour qu'une molécule ait de grandes chances d'arriver en clinique, il faut qu'elle soit « la plus petite possible ». En effet, bien que les peptides soient des macromolécules, les résultats que nous avons obtenus ont démontré leur efficacité sur les mutations de résistance simple à multiples. De plus les peptides ont l'avantage d'être modulables et peuvent donc être personnalisés et adaptés selon les cas.

En perspective de ces travaux, nous proposons de co-cristalliser P_{ID4} avec RT et également P27 avec RT afin de pouvoir déterminer avec précision les sites de fixation de ces peptides. Une autre méthode consiste aussi en l'utilisation de la spectroscopie de masse pour localiser ces sites. En effet on pourrait réaliser des pontages chimiques entre le peptide et la RT, procéder à des digestions partielles du complexe et analyser les fragments obtenus par spectrométrie de masse. Par ailleurs, nous avons aussi proposé de cycliser ces peptides afin de les stabiliser et les protéger d'une dégradation potentielle par les protéases. D'ailleurs, les travaux préliminaires réalisés sur P27 cyclique ont donné des résultats qui complètent avec ceux obtenus dans le cas la forme linéaire de P27. De plus l'étude structurale du peptide P27 par dichroïsme circulaire montre que le cyclique est plus structuré en hélice α que le

linéaire, et donc qu'il présente potentiellement une meilleure stabilité. Cependant l'administration des médicaments à base de peptide tels que le Fuseon se fait uniquement par injection intra veineuse. Il serait donc intéressant de remplacer également les acides aminés naturels de ces peptides de conformation L par des résidus de conformation D qui ne sont pas reconnus par les protéases et donc de faciliter leur administration par voie orale pour améliorer le confort des patients. Etant donné que les motifs inhibiteurs de ces peptides ont été identifiés, nous pouvons aussi concevoir des molécules peptido-mimétiques qui conserveraient les mêmes propriétés que nos clusters d'inhibition et qui seraient exemptes de toute contrainte de dégradation sans pour autant être toxiques. A long terme, nos peptides pourraient être proposés comme solution pour les patients qui ne sont pas réceptifs aux traitements actuels, pour ceux qui sont confrontés à un problème de toxicité et/ou de résistance et que l'on ne peut plus traiter, mais aussi nos peptides pourraient compléter et renforcer la combinaison des médicaments actuellement proposés pour palier à toute émergence de souches résistantes.

Enfin, comme nos peptides sont de petite taille (10 à 20 résidus), ils sont peu immunogènes, et ne sont pas toxiques. De ce fait, cette stratégie peptidique qui consiste à cibler les interfaces protéine/protéine peut-être élargie à d'autres cibles sur des étapes clés du développement du VIH. Notamment l'intégrase, la poly-protéine Pol, ou même le domaine RNase H de la RT qui constituent de bonnes cibles pour l'élaboration de nouveaux peptides inhibiteurs

Références bibliographiques

Abbondanzieri, E. A., G. Bokinsky, J. W. Rausch, J. X. Zhang, S. F. Le Grice and X. Zhuang (2008). "Dynamic binding orientations direct activity of HIV reverse transcriptase." Nature **453**(7192): 184-189.

Adje-Toure, C., B. Celestin, D. Hanson, T. H. Roels, K. Hertogs, B. Larder, F. Diomande, M. Peeters, S. Eholie, E. Lackritz, T. Chorba and J. N. Nkengasong (2003). "Prevalence of genotypic and phenotypic HIV-1 drug-resistant strains among patients who have rebound in viral load while receiving antiretroviral therapy in the UNAIDS-Drug Access Initiative in Abidjan, Cote d'Ivoire." AIDS **17 Suppl 3**: S23-29.

Agopian, A., J. Depollier, C. Lionne and G. Divita (2007). "p66 Trp24 and Phe61 are essential for accurate association of HIV-1 reverse transcriptase with primer/template." J Mol Biol **373**(1): 127-140.

Agopian, A., E. Gros, G. Aldrian-Herrada, N. Bosquet, P. Clayette and G. Divita (2009). "A new generation of peptide-based inhibitors targeting HIV-1 reverse transcriptase conformational flexibility." J Biol Chem **284**(1): 254-264.

Aguiar, R. S. and B. M. Peterlin (2008). "APOBEC3 proteins and reverse transcription." Virus Res **134**(1-2): 74-85.

Ali, A., B. D. Jamieson and O. O. Yang (2003). "Half-genome human immunodeficiency virus type 1 constructs for rapid production of reporter viruses." J Virol Methods **110**(2): 137-142.

Arion, D., N. Kaushik, S. McCormick, G. Borkow and M. A. Parniak (1998). "Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase." Biochemistry **37**(45): 15908-15917.

Arion, D., N. Sluis-Cremer, K. L. Min, M. E. Abram, R. S. Fletcher and M. A. Parniak (2002). "Mutational analysis of Tyr-501 of HIV-1 reverse transcriptase. Effects on ribonuclease H activity and inhibition of this activity by N-acylhydrazones." J Biol Chem **277**(2): 1370-1374.

Audoly, G., M. R. Popoff and P. Gluschankof (2005). "Involvement of a small GTP binding protein in HIV-1 release." Retrovirology **2**: 48.

Ball, R. A., T. Kinchelow and I. S. R. S. Group (2003). "Injection site reactions with the HIV-1 fusion inhibitor enfuvirtide." J Am Acad Dermatol **49**(5): 826-831.

Balzarini, J. (2004). "Current status of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus type 1." Curr Top Med Chem **4**(9): 921-944.

Balzarini, J., L. Naesens, S. Aquaro, T. Knispel, C. Perno, E. De Clercq and C. Meier (1999). "Intracellular metabolism of CycloSaligenyl 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine monophosphate, a prodrug of 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (zidovudine)." Mol Pharmacol **56**(6): 1354-1361.

Bar-Magen, T., D. A. Donahue, E. I. McDonough, B. D. Kuhl, V. H. Faltenbacher, H. Xu, V. Michaud, R. D. Sloan and M. A. Wainberg (2010). "HIV-1 subtype B and C integrase enzymes exhibit differential patterns of resistance to integrase inhibitors in biochemical assays." AIDS **24**(14): 2171-2179.

Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-871.

Basu, V. P., M. Song, L. Gao, S. T. Rigby, M. N. Hanson and R. A. Bambara (2008). "Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription." Virus Res **134**(1-2): 19-38.

Batisse, J., S. Guerrero, S. Bernacchi, L. Richert, J. Godet, V. Goldschmidt, Y. Mely, R. Marquet, H. de Rocquigny and J. C. Paillart (2013). "APOBEC3G impairs the multimerization of the HIV-1 Vif protein in living cells." J Virol.

Bazmi, H. Z., J. L. Hammond, S. C. Cavalcanti, C. K. Chu, R. F. Schinazi and J. W. Mellors (2000). "In vitro selection of mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that decrease susceptibility to (-)-beta-D-dioxolane-guanosine and suppress resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine." Antimicrob Agents Chemother **44**(7): 1783-1788.

Beilhartz, G. L. and M. Gotte (2010). "HIV-1 Ribonuclease H: Structure, Catalytic Mechanism and Inhibitors." Viruses **2**(4): 900-926.

Berger, E. A., R. W. Doms, E. M. Fenyo, B. T. Korber, D. R. Littman, J. P. Moore, Q. J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski and R. A. Weiss (1998). "A new classification for HIV-1." Nature **391**(6664): 240.

Bethell, R. C., Y. S. Lie and N. T. Parkin (2005). "In vitro activity of SPD754, a new deoxycytidine nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI), against 215 HIV-1 isolates resistant to other NRTIs." Antivir Chem Chemother **16**(5): 295-302.

Billamboz, M., F. Bailly, M. L. Barreca, L. De Luca, J. F. Mouscadet, C. Calmels, M. L. Andreola, M. Witvrouw, F. Christ, Z. Debyser and P. Cotelle (2008). "Design, synthesis, and biological evaluation of a series of 2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones as dual inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the reverse transcriptase RNase H domain." J Med Chem **51**(24): 7717-7730.

Billamboz, M., F. Bailly, C. Lion, N. Touati, H. Vezin, C. Calmels, M. L. Andreola, F. Christ, Z. Debyser and P. Cotelle (2011). "Magnesium chelating 2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones, as inhibitors of HIV-1 integrase and/or the HIV-1 reverse transcriptase ribonuclease H domain: discovery of a novel selective inhibitor of the ribonuclease H function." J Med Chem **54**(6): 1812-1824.

Blanco-Melo, D., S. Venkatesh and P. D. Bieniasz (2012). "Intrinsic cellular defenses against human immunodeficiency viruses." Immunity **37**(3): 399-411.

Blattner, W., R. C. Gallo and H. M. Temin (1988). "HIV causes AIDS." Science **241**(4865): 515-516.

Bleul, C. C., L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer and C. R. Mackay (1997). "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1925-1930.

Bobardt, M. D., A. C. Saphire, H. C. Hung, X. Yu, B. Van der Schueren, Z. Zhang, G. David and P. A. Galloway (2003). "Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes." Immunity **18**(1): 27-39.

Borkow, G., R. S. Fletcher, J. Barnard, D. Arion, D. Motakis, G. I. Dmitrienko and M. A. Parniak (1997). "Inhibition of the ribonuclease H and DNA polymerase activities of HIV-1 reverse transcriptase by N-(4-tert-butylbenzoyl)-2-hydroxy-1-naphthaldehyde hydrazone." Biochemistry **36**(11): 3179-3185.

Bounou, S., J. E. Leclerc and M. J. Tremblay (2002). "Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4(+)-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo." J Virol **76**(3): 1004-1014.

Boyer, P. L., H. Q. Gao, P. K. Clark, S. G. Sarafianos, E. Arnold and S. H. Hughes (2001). "YADD mutants of human immunodeficiency virus type 1 and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase are resistant to lamivudine triphosphate (3TCTP) in vitro." J Virol **75**(14): 6321-6328.

Brehm, J. H., D. Koontz, J. D. Meter, V. Pathak, N. Sluis-Cremer and J. W. Mellors (2007). "Selection of mutations in the connection and RNase H domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that increase resistance to 3'-azido-3'-dideoxythymidine." J Virol **81**(15): 7852-7859.

Bukrinsky, M. I., N. Sharova, M. P. Dempsey, T. L. Stanwick, A. G. Bukrinskaya, S. Haggerty and M. Stevenson (1992). "Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6580-6584.

Camarasa, M. J., S. Velazquez, A. San-Felix, M. J. Perez-Perez and F. Gago (2006). "Dimerization inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase, protease and integrase: a single mode of inhibition for the three HIV enzymes?" Antiviral Res **71**(2-3): 260-267.

Champoux, J. J. and S. J. Schultz (2009). "Ribonuclease H: properties, substrate specificity and roles in retroviral reverse transcription." FEBS J **276**(6): 1506-1516.

Charpentier, B. (2008). "[New therapeutic targets for antibodies and recombinant proteins in organ transplantation]." Bull Acad Natl Med **192**(5): 883-893; discussion 893-884.

Chatel-Chaix, L., J. F. Clement, C. Martel, V. Beriault, A. Gatignol, L. DesGroseillers and A. J. Mouland (2004). "Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles." Mol Cell Biol **24**(7): 2637-2648.

Chiu, Y. L. and W. C. Greene (2008). "The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements." Annu Rev Immunol **26**: 317-353.

Cho, M. W., M. K. Lee, M. C. Carney, J. F. Berson, R. W. Doms and M. A. Martin (1998). "Identification of determinants on a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4." J Virol **72**(3): 2509-2515.

Chun, T. W., D. Finzi, J. Margolick, K. Chadwick, D. Schwartz and R. F. Siliciano (1995). "In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency." Nat Med **1**(12): 1284-1290.

Chung, S., D. M. Himmel, J. K. Jiang, K. Wojtak, J. D. Bauman, J. W. Rausch, J. A. Wilson, J. A. Beutler, C. J. Thomas, E. Arnold and S. F. Le Grice (2011). "Synthesis, activity, and structural analysis of novel alpha-hydroxytropolone inhibitors of human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated ribonuclease H." J Med Chem **54**(13): 4462-4473.

Chung, S., J. T. Miller, M. Lapkouski, L. Tian, W. Yang and S. F. Le Grice (2013). "Examining the role of the HIV-1 reverse transcriptase p51 subunit in positioning and hydrolysis of RNA/DNA hybrids." J Biol Chem **288**(22): 16177-16184.

Chung, S., M. Wendeler, J. W. Rausch, G. Beilhartz, M. Gotte, B. R. O'Keefe, A. Birmingham, J. A. Beutler, S. Liu, X. Zhuang and S. F. Le Grice (2010). "Structure-activity analysis of vinylogous urea inhibitors of human immunodeficiency virus-encoded ribonuclease H." Antimicrob Agents Chemother **54**(9): 3913-3921.

Cihlar, T. and A. S. Ray (2010). "Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine." Antiviral Res **85**(1): 39-58.

Clapham, P. R. and R. A. Weiss (1997). "Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors." Nature **388**(6639): 230-231.

Costi, R., R. Di Santo, M. Artico, A. Roux, R. Ragno, S. Massa, E. Tramontano, M. La Colla, R. Loddo, M. E. Marongiu, A. Pani and P. La Colla (2004). "6-aryl-2,4-dioxo-5-hexenoic acids, novel integrase inhibitors active against HIV-1 multiplication in cell-based assays." Bioorg Med Chem Lett **14**(7): 1745-1749.

Costi, R., R. D. Santo, M. Artico, S. Massa, R. Ragno, R. Loddo, M. La Colla, E. Tramontano, P. La Colla and A. Pani (2004). "2,6-Bis(3,4,5-trihydroxybenzylidene) derivatives of cyclohexanone: novel potent HIV-1 integrase inhibitors that prevent HIV-1 multiplication in cell-based assays." Bioorg Med Chem **12**(1): 199-215.

Cruchaga, C., E. Anso, A. Rouzaut and J. J. Martinez-Irujo (2006). "Selective excision of chain-terminating nucleotides by HIV-1 reverse transcriptase with phosphonoformate as substrate." J Biol Chem **281**(38): 27744-27752.

Cui, H. K., B. Zhao, Y. Li, Y. Guo, H. Hu, L. Liu and Y. G. Chen (2013). "Design of stapled alpha-helical peptides to specifically activate Wnt/beta-catenin signaling." Cell Res **23**(4): 581-584.

Curtis, B. M., S. Scharnowske and A. J. Watson (1992). "Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(17): 8356-8360.

Das, K., P. J. Lewi, S. H. Hughes and E. Arnold (2005). "Crystallography and the design of anti-AIDS drugs: conformational flexibility and positional adaptability are important in the design of non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors." Prog Biophys Mol Biol **88**(2): 209-231.

Das, K., S. E. Martinez, J. D. Bauman and E. Arnold (2012). "HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism." Nat Struct Mol Biol **19**(2): 253-259.

Das, K. C. and C. K. Das (2000). "Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions." Biochem Biophys Res Commun **277**(2): 443-447.

Davis, C. A., M. A. Parniak and S. H. Hughes (2011). "The effects of RNase H inhibitors and nevirapine on the susceptibility of HIV-1 to AZT and 3TC." Virology **419**(2): 64-71.

De Clercq, E. (1999). "Perspectives of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection." Farmacology **54**(1-2): 26-45.

De Silva, F. S., D. S. Venturini, E. Wagner, P. R. Shank and S. Sharma (2001). "CD4-independent infection of human B cells with HIV type 1: detection of unintegrated viral DNA." AIDS Res Hum Retroviruses **17**(17): 1585-1598.

Delviks-Frankenberry, K. A., G. N. Nikolenko, R. Barr and V. K. Pathak (2007). "Mutations in human immunodeficiency virus type 1 RNase H primer grip enhance 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance." J Virol **81**(13): 6837-6845.

Delviks-Frankenberry, K. A., G. N. Nikolenko and V. K. Pathak (2010). "The "Connection" Between HIV Drug Resistance and RNase H." Viruses **2**(7): 1476-1503.

Demillo, V. G., F. Goulinet-Mateo, J. Kim, D. Schols, K. Vermeire and T. W. Bell (2011). "Unsymmetrical cyclotriazadisulfonamide (CADA) compounds as human CD4 receptor down-modulating agents." J Med Chem **54**(16): 5712-5721.

Depienne, C., A. Mousnier, H. Leh, E. Le Rouzic, D. Dormont, S. Benichou and C. Dargemont (2001). "Characterization of the nuclear import pathway for HIV-1 integrase." J Biol Chem **276**(21): 18102-18107.

Derse, D., K. F. Bastow and Y. Cheng (1982). "Characterization of the DNA polymerases induced by a group of herpes simplex virus type I variants selected for growth in the presence of phosphonoformic acid." J Biol Chem **257**(17): 10251-10260.

Deshayes, S., M. C. Morris, G. Divita and F. Heitz (2005). "Interactions of primary amphipathic cell penetrating peptides with model membranes: consequences on the mechanisms of intracellular delivery of therapeutics." Curr Pharm Des **11**(28): 3629-3638.

Desimmie, B. A., J. Demeulemeester, V. Suchaud, O. Taltynov, M. Billamboz, C. Lion, F. Bailly, S. V. Strelkov, Z. Debyser, P. Cotelle and F. Christ (2013). "2-Hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones (HIDs), novel inhibitors of HIV integrase with a high barrier to resistance." ACS Chem Biol **8**(6): 1187-1194.

Ding, J., K. Das, C. Tantillo, W. Zhang, A. D. Clark, Jr., S. Jessen, X. Lu, Y. Hsiou, A. Jacobo-Molina, K. Andries and et al. (1995). "Structure of HIV-1 reverse transcriptase in a complex with the non-nucleoside inhibitor alpha-APA R 95845 at 2.8 Å resolution." Structure **3**(4): 365-379.

Divita, G., J. G. Baillon, K. Rittinger, J. C. Chermann and R. S. Goody (1995). "Interface peptides as structure-based human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitors." J Biol Chem **270**(48): 28642-28646.

Divita, G., K. Rittinger, C. Geourjon, G. Deleage and R. S. Goody (1995). "Dimerization kinetics of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptase: a two step process." J Mol Biol **245**(5): 508-521.

Divita, G., K. Rittinger, T. Restle, U. Immendorfer and R. S. Goody (1995). "Conformational stability of dimeric HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases." Biochemistry **34**(50): 16337-16346.

Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman and R. W. Doms (1996). "A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors." Cell **85**(7): 1149-1158.

Douaisi, M., S. Dussart, M. Courcou, G. Bessou, R. Vigne and E. Decroly (2004). "HIV-1 and MLV Gag proteins are sufficient to recruit APOBEC3G into virus-like particles." Biochem Biophys Res Commun **321**(3): 566-573.

Dutschman, G. E., E. G. Bridges, S. H. Liu, E. Gullen, X. Guo, M. Kukhanova and Y. C. Cheng (1998). "Metabolism of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-beta-L(-)-5-fluorocytidine and its activity in combination with clinically approved anti-human immunodeficiency virus beta-D(+) nucleoside analogs in vitro." Antimicrob Agents Chemother **42**(7): 1799-1804.

Dutschman, G. E., S. P. Grill, E. A. Gullen, K. Haraguchi, S. Takeda, H. Tanaka, M. Baba and Y. C. Cheng (2004). "Novel 4'-substituted stavudine analog with improved anti-human immunodeficiency virus activity and decreased cytotoxicity." Antimicrob Agents Chemother **48**(5): 1640-1646.

Ellerman, V. a. B., O (1908). "Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infectiionskr Hyg Abt

Esnouf, R. M., J. Ren, A. L. Hopkins, C. K. Ross, E. Y. Jones, D. K. Stammers and D. I. Stuart (1997). "Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3984-3989.

Esposito, F., A. Corona and E. Tramontano (2012). "HIV-1 Reverse Transcriptase Still Remains a New Drug Target: Structure, Function, Classical Inhibitors, and New Inhibitors with Innovative Mechanisms of Actions." Mol Biol Int **2012**: 586401.

Esposito, F., T. Kharlamova, S. Distinto, L. Zinzula, Y. C. Cheng, G. Dutschman, G. Floris, P. Markt, A. Corona and E. Tramontano (2011). "Alizarine derivatives as new dual inhibitors of the HIV-1 reverse transcriptase-associated DNA polymerase and RNase H activities effective also on the RNase H activity of non-nucleoside resistant reverse transcriptases." FEBS J **278**(9): 1444-1457.

Este, J. A. and A. Telenti (2007). "HIV entry inhibitors." Lancet **370**(9581): 81-88.

Felts, A. K., K. Labarge, J. D. Bauman, D. V. Patel, D. M. Himmel, E. Arnold, M. A. Parniak and R. M. Levy (2011). "Identification of alternative binding sites for inhibitors of HIV-1 ribonuclease H through comparative analysis of virtual enrichment studies." J Chem Inf Model **51**(8): 1986-1998.

Feng, J. Y. and K. S. Anderson (1999). "Mechanistic studies comparing the incorporation of (+) and (-) isomers of 3TCTP by HIV-1 reverse transcriptase." Biochemistry **38**(1): 55-63.

Feng, J. Y., E. Murakami, S. M. Zorca, A. A. Johnson, K. A. Johnson, R. F. Schinazi, P. A. Furman and K. S. Anderson (2004). "Relationship between antiviral activity and host toxicity: comparison of the incorporation efficiencies of 2',3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine-triphosphate analogs by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and human mitochondrial DNA polymerase." Antimicrob Agents Chemother **48**(4): 1300-1306.

Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy and E. A. Berger (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-877.

Fisher, T. S., T. Darden and V. R. Prasad (2003). "Substitutions at Phe61 in the beta3-beta4 hairpin of HIV-1 reverse transcriptase reveal a role for the Fingers subdomain in strand displacement DNA synthesis." J Mol Biol **325**(3): 443-459.

Fouchier, R. A., M. Groenink, N. A. Kootstra, M. Tersmette, H. G. Huisman, F. Miedema and H. Schuitemaker (1992). "Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule." J Virol **66**(5): 3183-3187.

Freed, E. O. (1998). "HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle." Virology **251**(1): 1-15.

Furfine, E. S. and J. E. Reardon (1991). "Reverse transcriptase.RNase H from the human immunodeficiency virus. Relationship of the DNA polymerase and RNA hydrolysis activities." J Biol Chem **266**(1): 406-412.

Furman, P. A., J. Jeffrey, L. L. Kiefer, J. Y. Feng, K. S. Anderson, K. Borroto-Esoda, E. Hill, W. C. Copeland, C. K. Chu, J. P. Sommadossi, I. Liberman, R. F. Schinazi and G. R. Painter (2001). "Mechanism of action of 1-beta-D-2,6-diaminopurine dioxolane, a prodrug of the

human immunodeficiency virus type 1 inhibitor 1-beta-D-dioxolane guanosine." Antimicrob Agents Chemother **45**(1): 158-165

Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch and M. Popovic (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 865-867.

Gao, H. Q., S. G. Sarafianos, E. Arnold and S. H. Hughes (2001). "RNase H cleavage of the 5' end of the human immunodeficiency virus type 1 genome." J Virol **75**(23): 11874-11880.

Garrido, C., C. de Mendoza and V. Soriano (2008). "[Resistance to integrase inhibitors]." Enferm Infecc Microbiol Clin **26 Suppl 12**: 40-46.

Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka and W. I. Sundquist (2001). "Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding." Cell **107**(1): 55-65.

Ghafouri, M., S. Amini, K. Khalili and B. E. Sawaya (2006). "HIV-1 associated dementia: symptoms and causes." Retrovirology **3**: 28.

Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines and M. De Wilde (1989). "Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells." Cell **59**(1): 103-112.

Ghosh, M., P. S. Jacques, D. W. Rodgers, M. Ottman, J. L. Darlix and S. F. Le Grice (1996). "Alterations to the primer grip of p66 HIV-1 reverse transcriptase and their consequences for template-primer utilization." Biochemistry **35**(26): 8553-8562.

Goff, S. P. (1990). "Integration of retroviral DNA into the genome of the infected cell." Cancer Cells **2**(6): 172-178.

Gorry, P. R., C. Ong, J. Thorpe, S. Bannwarth, K. A. Thompson, A. Gatignol, S. L. Vesselingh and D. F. Purcell (2003). "Astrocyte infection by HIV-1: mechanisms of restricted virus replication, and role in the pathogenesis of HIV-1-associated dementia." Curr HIV Res **1**(4): 463-473.

Granelli-Piperno, A., A. Pritsker, M. Pack, I. Shimeliovich, J. F. Arrighi, C. G. Park, C. Trumpfheller, V. Piguet, T. M. Moran and R. M. Steinman (2005). "Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction." J Immunol **175**(7): 4265-4273.

Grohmann, D., V. Corradi, M. Elbasyouny, A. Baude, F. Horenkamp, S. D. Laufer, F. Manetti, M. Botta and T. Restle (2008). "Small molecule inhibitors targeting HIV-1 reverse transcriptase dimerization." ChemBiochem **9**(6): 916-922.

Grohmann, D., J. Godet, Y. Mely, J. L. Darlix and T. Restle (2008). "HIV-1 nucleocapsid traps reverse transcriptase on nucleic acid substrates." Biochemistry **47**(46): 12230-12240.

Gross, L. (1957). "Development and serial cellfree passage of a highly potent strain of mouse leukemia virus." Proc Soc Exp Biol Med **94**(4): 767-771.

Gu, Z., B. Allard, J. M. de Muys, J. Lippens, R. F. Rando, N. Nguyen-Ba, C. Ren, P. McKenna, D. L. Taylor and R. C. Bethell (2006). "In vitro antiretroviral activity and in vitro toxicity profile of SPD754, a new deoxycytidine nucleoside reverse transcriptase inhibitor for treatment of human immunodeficiency virus infection." Antimicrob Agents Chemother **50**(2): 625-631.

Gu, Z., M. A. Wainberg, N. Nguyen-Ba, L. L'Heureux, J. M. de Muys, T. L. Bowlin and R. F. Rando (1999). "Mechanism of action and in vitro activity of 1',3'-dioxolanyl-purine nucleoside analogues against sensitive and drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants." Antimicrob Agents Chemother **43**(10): 2376-2382.

Hachiya, A., E. N. Kodama, S. G. Sarafianos, M. M. Schuckmann, Y. Sakagami, M. Matsuoka, M. Takiguchi, H. Gatanaga and S. Oka (2008). "Amino acid mutation N348I in the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers multiclass resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors." J Virol **82**(7): 3261-3270.

Hammond, J. L., U. M. Parikh, D. L. Koontz, S. Schlueter-Wirtz, C. K. Chu, H. Z. Bazmi, R. F. Schinazi and J. W. Mellors (2005). "In vitro selection and analysis of human immunodeficiency virus type 1 resistant to derivatives of beta-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-5-fluorocytidine." Antimicrob Agents Chemother **49**(9): 3930-3932.

Han, Y., M. Wind-Rotolo, H. C. Yang, J. D. Siliciano and R. F. Siliciano (2007). "Experimental approaches to the study of HIV-1 latency." Nat Rev Microbiol **5**(2): 95-106.

Hang, J. Q., S. Rajendran, Y. Yang, Y. Li, P. W. In, H. Overton, K. E. Parkes, N. Cammack, J. A. Martin and K. Klumpp (2004). "Activity of the isolated HIV RNase H domain and specific inhibition by N-hydroxyimides." Biochem Biophys Res Commun **317**(2): 321-329.

Hare, S., S. J. Smith, M. Metifiot, A. Jaxa-Chamiec, Y. Pommier, S. H. Hughes and P. Cherepanov (2011). "Structural and functional analyses of the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir (S/GSK1349572)." Mol Pharmacol **80**(4): 565-572.

Harouse, J. M., C. Buckner, A. Gettie, R. Fuller, R. Bohm, J. Blanchard and C. Cheng-Mayer (2003). "CD8+ T cell-mediated CXC chemokine receptor 4-simian/human immunodeficiency virus suppression in dually infected rhesus macaques." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10977-10982.

Harris, K. S., W. Brabant, S. Styrchak, A. Gall and R. Daifuku (2005). "KP-1212/1461, a nucleoside designed for the treatment of HIV by viral mutagenesis." Antiviral Res **67**(1): 1-9.

Hayakawa, H., S. Kohgo, K. Kitano, N. Ashida, E. Kodama, H. Mitsuya and H. Ohruji (2004). "Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV-1." Antivir Chem Chemother **15**(4): 169-187.

Henderson, L. E., R. Sowder, T. D. Copeland, S. Oroszlan, L. O. Arthur, W. G. Robey and P. J. Fischinger (1987). "Direct identification of class II histocompatibility DR proteins in preparations of human T-cell lymphotropic virus type III." J Virol **61**(2): 629-632.

Henderson, L. E., R. C. Sowder, G. W. Smythers and S. Oroszlan (1987). "Chemical and immunological characterizations of equine infectious anemia virus gag-encoded proteins." J Virol **61**(4): 1116-1124.

Henriet, S., G. Mercenne, S. Bernacchi, J. C. Paillart and R. Marquet (2009). "Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors." Microbiol Mol Biol Rev **73**(2): 211-232.

Herdewijn, P., J. Balzarini, M. Baba, R. Pauwels, A. Van Aerschot, G. Janssen and E. De Clercq (1988). "Synthesis and anti-HIV activity of different sugar-modified pyrimidine and purine nucleosides." J Med Chem **31**(10): 2040-2048.

Herzmann, C., K. Arasteh, R. L. Murphy, H. Schulbin, P. Kreckel, D. Drauz, R. F. Schinazi, A. Beard, L. Cartee and M. J. Otto (2005). "Safety, pharmacokinetics, and efficacy of (+/-)-beta-2',3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine with efavirenz and stavudine in antiretroviral-naive human immunodeficiency virus-infected patients." Antimicrob Agents Chemother **49**(7): 2828-2833.

Himmel, D. M., S. G. Sarafianos, S. Dharmasena, M. M. Hossain, K. McCoy-Simandle, T. Iliina, A. D. Clark, Jr., J. L. Knight, J. G. Julias, P. K. Clark, K. Krogh-Jespersen, R. M. Levy, S. H. Hughes, M. A. Parniak and E. Arnold (2006). "HIV-1 reverse transcriptase structure with RNase H inhibitor dihydroxy benzoyl naphthyl hydrazone bound at a novel site." ACS Chem Biol **1**(11): 702-712.

Hioe, C. E., M. Tuen, P. C. Chien, Jr., G. Jones, S. Ratto-Kim, P. J. Norris, W. J. Moretto, D. F. Nixon, M. K. Gorny and S. Zolla-Pazner (2001). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 gp120 presentation to CD4 T cells by antibodies specific for the CD4 binding domain of gp120." J Virol **75**(22): 10950-10957.

Ho, H. T. and M. J. Hitchcock (1989). "Cellular pharmacology of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine, a nucleoside analog active against human immunodeficiency virus." Antimicrob Agents Chemother **33**(6): 844-849.

Hooper, C. (1998). "Poxvirus dilemmas." N Engl J Med **339**(27): 2027-2028.

Hu, W. S. and H. M. Temin (1990). "Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1556-1560.

Hu, W. S. and H. M. Temin (1990). "Retroviral recombination and reverse transcription." Science **250**(4985): 1227-1233.

Huang, H., R. Chopra, G. L. Verdine and S. C. Harrison (1998). "Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance." Science **282**(5394): 1669-1675.

Huber, H. E. and C. C. Richardson (1990). "Processing of the primer for plus strand DNA synthesis by human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase." J Biol Chem **265**(18): 10565-10573.

Im, G. J., E. Tramontano, C. J. Gonzalez and Y. C. Cheng (1993). "Identification of the amino acid in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase involved in the pyrophosphate binding of antiviral nucleoside triphosphate analogs and phosphonoformate. Implications for multiple drug resistance." Biochem Pharmacol **46**(12): 2307-2313.

Izumi, T., K. Shirakawa and A. Takaori-Kondo (2008). "Cytidine deaminases as a weapon against retroviruses and a new target for antiviral therapy." Mini Rev Med Chem **8**(3): 231-238.

Jacobo-Molina, A., J. Ding, R. G. Nanni, A. D. Clark, Jr., X. Lu, C. Tantillo, R. L. Williams, G. Kamer, A. L. Ferris, P. Clark and et al. (1993). "Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6320-6324.

Jacques, P. S., B. M. Wohrl, M. Ottmann, J. L. Darlix and S. F. Le Grice (1994). "Mutating the "primer grip" of p66 HIV-1 reverse transcriptase implicates tryptophan-229 in template-primer utilization." J Biol Chem **269**(42): 26472-26478.

Jamjoom, G. A. (1991). "Protease inhibitors as potential therapeutic agents for AIDS." Ann Saudi Med **11**(5): 568-575.

Janssen, P. A., P. J. Lewi, E. Arnold, F. Daeyaert, M. de Jonge, J. Heeres, L. Koymans, M. Vinkers, J. Guillemont, E. Pasquier, M. Kukla, D. Ludovici, K. Andries, M. P. de Bethune, R. Pauwels, K. Das, A. D. Clark, Jr., Y. V. Frenkel, S. H. Hughes, B. Medaer, F. De Knaep, H. Bohets, F. De Clerck, A. Lampo, P. Williams and P. Stoffels (2005). "In search of a novel anti-HIV drug: multidisciplinary coordination in the discovery of 4-[[4-[[4-[(1E)-2-cyanoethenyl]-2,6-dimethylphenyl]amino]-2-pyrimidinyl]amino]benzotrile (R278474, rilpivirine)." J Med Chem **48**(6): 1901-1909.

Jarmuz, A., A. Chester, J. Bayliss, J. Gisbourne, I. Dunham, J. Scott and N. Navaratnam (2002). "An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22." Genomics **79**(3): 285-296.

Ji, X., G. J. Klarmann and B. D. Preston (1996). "Effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nucleocapsid protein on HIV-1 reverse transcriptase activity in vitro." Biochemistry **35**(1): 132-143.

Johnson, J. A., J. F. Li, X. Wei, J. Lipscomb, D. Irlbeck, C. Craig, A. Smith, D. E. Bennett, M. Monsour, P. Sandstrom, E. R. Lanier and W. Heneine (2008). "Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naive populations and associate with reduced treatment efficacy." PLoS Med **5**(7): e158.

Jung, A., R. Maier, J. P. Vartanian, G. Bocharov, V. Jung, U. Fischer, E. Meese, S. Wain-Hobson and A. Meyerhans (2002). "Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients." Nature **418**(6894): 144.

Katz, R. A. and A. M. Skalka (1994). "The retroviral enzymes." Annu Rev Biochem **63**: 133-173.

Kawamoto, A., E. Kodama, S. G. Sarafianos, Y. Sakagami, S. Kohgo, K. Kitano, N. Ashida, Y. Iwai, H. Hayakawa, H. Nakata, H. Mitsuya, E. Arnold and M. Matsuoka (2008). "2'-deoxy-4'-C-ethynyl-2-halo-adenosines active against drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants." Int J Biochem Cell Biol **40**(11): 2410-2420.

Kellinger, M. W. and K. A. Johnson (2010). "Nucleotide-dependent conformational change governs specificity and analog discrimination by HIV reverse transcriptase." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(17): 7734-7739.

Kirby, K. A., K. Singh, E. Michailidis, B. Marchand, E. N. Kodama, N. Ashida, H. Mitsuya, M. A. Parniak and S. G. Sarafianos (2011). "The sugar ring conformation of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine and its recognition by the polymerase active site of HIV reverse transcriptase." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **57**(1): 40-46.

Klumpp, K., J. Q. Hang, S. Rajendran, Y. Yang, A. Derosier, P. Wong Kai In, H. Overton, K. E. Parkes, N. Cammack and J. A. Martin (2003). "Two-metal ion mechanism of RNA cleavage by HIV RNase H and mechanism-based design of selective HIV RNase H inhibitors." Nucleic Acids Res **31**(23): 6852-6859.

Knight, J. L., Z. Zhou, E. Gallicchio, D. M. Himmel, R. A. Friesner, E. Arnold and R. M. Levy (2008). "Exploring structural variability in X-ray crystallographic models using protein local optimization by torsion-angle sampling." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **64**(Pt 4): 383-396.

Kobayashi, M., T. Yoshinaga, T. Seki, C. Wakasa-Morimoto, K. W. Brown, R. Ferris, S. A. Foster, R. J. Hazen, S. Miki, A. Suyama-Kagitani, S. Kawauchi-Miki, T. Taishi, T. Kawasuji, B. A. Johns, M. R. Underwood, E. P. Garvey, A. Sato and T. Fujiwara (2011). "In Vitro antiretroviral properties of S/GSK1349572, a next-generation HIV integrase inhibitor." Antimicrob Agents Chemother **55**(2): 813-821.

Kohlstaedt, L. A., J. Wang, J. M. Friedman, P. A. Rice and T. A. Steitz (1992). "Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor." Science **256**(5065): 1783-1790.

Korber, B., M. Muldoon, J. Theiler, F. Gao, R. Gupta, A. Lapedes, B. H. Hahn, S. Wolinsky and T. Bhattacharya (2000). "Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains." Science **288**(5472): 1789-1796.

Kwon, D. S., G. Gregorio, N. Bitton, W. A. Hendrickson and D. R. Littman (2002). "DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection." Immunity **16**(1): 135-144.

Lai, M. T., M. Lu, P. J. Felock, R. C. Hrin, Y. J. Wang, Y. Yan, S. Munshi, G. B. McGaughey, R. M. Tynebor, T. J. Tucker, T. M. Williams, J. A. Grobler, D. J. Hazuda, P. M. McKenna and M. D. Miller (2010). "Distinct mutation pathways of non-subtype B HIV-1 during in vitro resistance selection with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors." Antimicrob Agents Chemother **54**(11): 4812-4824.

Lansdon, E. B., K. M. Brendza, M. Hung, R. Wang, S. Mukund, D. Jin, G. Birkus, N. Kutty and X. Liu (2010). "Crystal structures of HIV-1 reverse transcriptase with etravirine (TMC125) and rilpivirine (TMC278): implications for drug design." J Med Chem **53**(10): 4295-4299.

Lapkouski, M., L. Tian, J. T. Miller, S. F. Le Grice and W. Yang (2013). "Complexes of HIV-1 RT, NNRTI and RNA/DNA hybrid reveal a structure compatible with RNA degradation." Nat Struct Mol Biol **20**(2): 230-236.

Lavigne, M., P. Roux, H. Buc and F. Schaeffer (1997). "DNA curvature controls termination of plus strand DNA synthesis at the centre of HIV-1 genome." J Mol Biol **266**(3): 507-524.

Le Grice, S. F. (2012). "Human immunodeficiency virus reverse transcriptase: 25 years of research, drug discovery, and promise." J Biol Chem **287**(49): 40850-40857.

Lin, T. S., M. Z. Luo, M. C. Liu, Y. L. Zhu, E. Gullen, G. E. Dutschman and Y. C. Cheng (1996). "Design and synthesis of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-beta-L-cytidine (beta-L-d4C) and 2',3'-dideoxy 2',3'-didehydro-beta-L-5-fluorocytidine (beta-L-Fd4C), two exceptionally potent inhibitors of human hepatitis B virus (HBV) and potent inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro." J Med Chem **39**(9): 1757-1759.

Liu, N. Q., A. S. Lossinsky, W. Popik, X. Li, C. Gujuluva, B. Kriederman, J. Roberts, T. Pushkarsky, M. Bukrinsky, M. Witte, M. Weinand and M. Fiala (2002). "Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway." J Virol **76**(13): 6689-6700.

Liu, S., E. A. Abbondanzieri, J. W. Rausch, S. F. Le Grice and X. Zhuang (2008). "Slide into action: dynamic shuttling of HIV reverse transcriptase on nucleic acid substrates." Science **322**(5904): 1092-1097.

Liu, S., B. T. Harada, J. T. Miller, S. F. Le Grice and X. Zhuang (2010). "Initiation complex dynamics direct the transitions between distinct phases of early HIV reverse transcription." Nat Struct Mol Biol **17**(12): 1453-1460.

Liu, Y., H. Liu, B. O. Kim, V. H. Gattone, J. Li, A. Nath, J. Blum and J. J. He (2004). "CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor." J Virol **78**(8): 4120-4133.

Loeb, L. A., J. M. Essigmann, F. Kazazi, J. Zhang, K. D. Rose and J. I. Mullins (1999). "Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1492-1497.

Lu, M., W. Ngo, Y. Mei, V. Munshi, C. Burlein, M. H. Loughran, P. D. Williams, D. J. Hazuda, M. D. Miller, J. A. Grobler, T. L. Diamond and M. T. Lai (2010). "Purification of untagged HIV-1 reverse transcriptase by affinity chromatography." Protein Expr Purif **71**(2): 231-239.

Lusso, P., P. L. Earl, F. Sironi, F. Santoro, C. Ripamonti, G. Scarlatti, R. Longhi, E. A. Berger and S. E. Burastero (2005). "Cryptic nature of a conserved, CD4-inducible V3 loop neutralization epitope in the native envelope glycoprotein oligomer of CCR5-restricted, but not CXCR4-using, primary human immunodeficiency virus type 1 strains." J Virol **79**(11): 6957-6968.

Mager, P. P. (2003). "Hybrid canonical-correlation neural-network approach applied to nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors (HEPT derivatives)." Curr Med Chem **10**(17): 1643-1659.

Magerus-Chatinet, A., H. Yu, S. Garcia, E. Ducloux, B. Terris and M. Bomsel (2007). "Galactosyl ceramide expressed on dendritic cells can mediate HIV-1 transfer from monocyte derived dendritic cells to autologous T cells." Virology **362**(1): 67-74.

Malet, I., O. Delelis, M. A. Valantin, B. Montes, C. Soulie, M. Wirden, L. Tchertanov, G. Peytavin, J. Reynes, J. F. Mouscadet, C. Katlama, V. Calvez and A. G. Marcelin (2008). "Mutations associated with failure of raltegravir treatment affect integrase sensitivity to the inhibitor in vitro." Antimicrob Agents Chemother **52**(4): 1351-1358.

Manouilov, K. K., Z. S. Xu, F. D. Boudinot, R. F. Schinazi and C. K. Chu (1997). "Lymphatic targeting of anti-HIV nucleosides: distribution of 2',3'-dideoxyinosine after intravenous and oral administration of dipalmitoylphosphatidyl prodrug in mice." Antiviral Res **34**(3): 91-99.

Mansky, L. M. and H. M. Temin (1995). "Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase." J Virol **69**(8): 5087-5094.

Marchand, B., E. P. Tchesnokov and M. Gotte (2007). "The pyrophosphate analogue foscarnet traps the pre-translocational state of HIV-1 reverse transcriptase in a Brownian ratchet model of polymerase translocation." J Biol Chem **282**(5): 3337-3346.

Marowitz, A. and R. Jordan (2007). "Midwifery management of prelabor rupture of membranes at term." J Midwifery Womens Health **52**(3): 199-206.

McCray, A. T. and G. Divita (1995). "ASN.1: defining a grammar for the UMLS knowledge sources." Proc Annu Symp Comput Appl Med Care: 868-872.

McCutchan, F. E., J. K. Carr, M. Bajani, E. Sanders-Buell, T. O. Harry, T. C. Stoeckli, K. E. Robbins, W. Gashau, A. Nasidi, W. Janssens and M. L. Kalish (1999). "Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria." Virology **254**(2): 226-234.

McDowell, J. A., G. E. Chittick, C. P. Stevens, K. D. Edwards and D. S. Stein (2000). "Pharmacokinetic interaction of abacavir (1592U89) and ethanol in human immunodeficiency virus-infected adults." Antimicrob Agents Chemother **44**(6): 1686-1690.

Mehellou, Y. and E. De Clercq (2010). "Twenty-six years of anti-HIV drug discovery: where do we stand and where do we go?" J Med Chem **53**(2): 521-538.

Mellors, J. W., H. Z. Bazmi, R. F. Schinazi, B. M. Roy, Y. Hsiou, E. Arnold, J. Weir and D. L. Mayers (1995). "Novel mutations in reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 reduce susceptibility to foscarnet in laboratory and clinical isolates." Antimicrob Agents Chemother **39**(5): 1087-1092.

Mellors, J. W., G. E. Dutschman, G. J. Im, E. Tramontano, S. R. Winkler and Y. C. Cheng (1992). "In vitro selection and molecular characterization of human immunodeficiency virus-1 resistant to non-nucleoside inhibitors of reverse transcriptase." Mol Pharmacol **41**(3): 446-451.

Mellors, J. W., G. J. Im, E. Tramontano, S. R. Winkler, D. J. Medina, G. E. Dutschman, H. Z. Bazmi, G. Piras, C. J. Gonzalez and Y. C. Cheng (1993). "A single conservative amino acid substitution in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus-1 confers resistance to (+)-(5S)-4,5,6,7-tetrahydro-5-methyl-6-(3-methyl-2-butenyl)imidazo[4,5, 1-jk][1,4]benzodiazepin-2(1H)-thione (TIBO R82150)." Mol Pharmacol **43**(1): 11-16.

Mewshaw, J. P., F. T. Myrick, D. A. Wakefield, B. J. Hooper, J. L. Harris, B. McCreedy and K. Borroto-Esoda (2002). "Dioxolane guanosine, the active form of the prodrug diaminopurine dioxolane, is a potent inhibitor of drug-resistant HIV-1 isolates from patients for whom standard nucleoside therapy fails." J Acquir Immune Defic Syndr **29**(1): 11-20.

Meyer, P. R., S. E. Matsuura, A. M. Mian, A. G. So and W. A. Scott (1999). "A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase." Mol Cell **4**(1): 35-43.

Meyer, P. R., S. E. Matsuura, A. G. So and W. A. Scott (1998). "Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13471-13476.

Meyer, P. R., A. J. Smith, S. E. Matsuura and W. A. Scott (2006). "Chain-terminating dinucleoside tetraphosphates are substrates for DNA polymerization by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase with increased activity against thymidine analogue-resistant mutants." Antimicrob Agents Chemother **50**(11): 3607-3614.

Michailidis, E., B. Marchand, E. N. Kodama, K. Singh, M. Matsuoka, K. A. Kirby, E. M. Ryan, A. M. Sawani, E. Nagy, N. Ashida, H. Mitsuya, M. A. Parniak and S. G. Sarafianos (2009). "Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-Ethyne-2-fluoro-2'-deoxyadenosine triphosphate, a translocation-defective reverse transcriptase inhibitor." J Biol Chem **284**(51): 35681-35691.

Mizrahi, V., R. L. Brooksbank and N. C. Nkabinde (1994). "Mutagenesis of the conserved aspartic acid 443, glutamic acid 478, asparagine 494, and aspartic acid 498 residues in the ribonuclease H domain of p66/p51 human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase. Expression and biochemical analysis." J Biol Chem **269**(30): 19245-19249.

Mizrahi, V., M. T. Usdin, A. Harington and L. R. Dudding (1990). "Site-directed mutagenesis of the conserved Asp-443 and Asp-498 carboxy-terminal residues of HIV-1 reverse transcriptase." Nucleic Acids Res **18**(18): 5359-5363.

Mohan, P., S. Loya, O. Avidan, S. Verma, G. S. Dhindsa, M. F. Wong, P. P. Huang, M. Yashiro, M. Baba and A. Hizi (1994). "Synthesis of naphthalenesulfonic acid small molecules as selective inhibitors of the DNA polymerase and ribonuclease H activities of HIV-1 reverse transcriptase." J Med Chem **37**(16): 2513-2519.

Moore, J. P., A. Trkola and T. Dragic (1997). "Co-receptors for HIV-1 entry." Curr Opin Immunol **9**(4): 551-562.

Morris, M. C., V. Robert-Hebmann, L. Chaloin, J. Mery, F. Heitz, C. Devaux, R. S. Goody and G. Divita (1999). "A new potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitor. A synthetic peptide derived from the interface subunit domains." J Biol Chem **274**(35): 24941-24946.

Morris, M. C., P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz and G. Divita (1997). "A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells." Nucleic Acids Res **25**(14): 2730-2736.

Mui, P. W., S. P. Jacober, K. D. Hargrave and J. Adams (1992). "Crystal structure of nevirapine, a non-nucleoside inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase, and computational alignment with a structurally diverse inhibitor." J Med Chem **35**(1): 201-202.

Nikolenko, G. N., K. A. Delviks-Frankenberry, S. Palmer, F. Maldarelli, M. J. Fivash, Jr., J. M. Coffin and V. K. Pathak (2007). "Mutations in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase increase 3'-azido-3'-deoxythymidine resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(1): 317-322.

Nikolenko, G. N., K. A. Delviks-Frankenberry and V. K. Pathak (2010). "A novel molecular mechanism of dual resistance to nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors." J Virol **84**(10): 5238-5249.

Nowotny, M., S. A. Gaidamakov, R. J. Crouch and W. Yang (2005). "Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: substrate specificity and metal-dependent catalysis." Cell **121**(7): 1005-1016.

Oberg, B. (1989). "Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium)." Pharmacol Ther **40**(2): 213-285.

Ott, D. E., L. V. Coren, D. G. Johnson, B. P. Kane, R. C. Sowder, 2nd, Y. D. Kim, R. J. Fisher, X. Z. Zhou, K. P. Lu and L. E. Henderson (2000). "Actin-binding cellular proteins inside human immunodeficiency virus type 1." Virology **266**(1): 42-51.

Paquette, J. S., J. F. Fortin, L. Blanchard and M. J. Tremblay (1998). "Level of ICAM-1 surface expression on virus producer cells influences both the amount of virion-bound host ICAM-1 and human immunodeficiency virus type 1 infectivity." J Virol **72**(11): 9329-9336.

Parikh, U. M., D. L. Koontz, C. K. Chu, R. F. Schinazi and J. W. Mellors (2005). "In vitro activity of structurally diverse nucleoside analogs against human immunodeficiency virus type 1 with the K65R mutation in reverse transcriptase." Antimicrob Agents Chemother **49**(3): 1139-1144.

- Pata, J. D., W. G. Stirtan, S. W. Goldstein and T. A. Steitz (2004). "Structure of HIV-1 reverse transcriptase bound to an inhibitor active against mutant reverse transcriptases resistant to other nonnucleoside inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(29): 10548-10553.
- Patterson, B. K., A. Landay, J. N. Siegel, Z. Flener, D. Pessis, A. Chaviano and R. C. Bailey (2002). "Susceptibility to human immunodeficiency virus-1 infection of human foreskin and cervical tissue grown in explant culture." Am J Pathol **161**(3): 867-873.
- Pauwels, R. (2004). "New non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in development for the treatment of HIV infections." Curr Opin Pharmacol **4**(5): 437-446.
- Pelchen-Matthews, A., B. Kramer and M. Marsh (2003). "Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages." J Cell Biol **162**(3): 443-455.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, M. S. Reitz, V. S. Kalyanaraman and R. C. Gallo (1981). "Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia." Nature **294**(5838): 268-271.
- Pomerantz, R. J. and D. L. Horn (2003). "Twenty years of therapy for HIV-1 infection." Nat Med **9**(7): 867-873.
- Puius, Y. A., Y. Zhao, M. Sullivan, D. S. Lawrence, S. C. Almo and Z. Y. Zhang (1997). "Identification of a second aryl phosphate-binding site in protein-tyrosine phosphatase 1B: a paradigm for inhibitor design." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13420-13425.
- Quashie, P. K., R. D. Sloan and M. A. Wainberg (2012). "Novel therapeutic strategies targeting HIV integrase." BMC Med **10**: 34.
- Ratner, L., R. C. Gallo and F. Wong-Staal (1985). "HTLV-III, LAV, ARV are variants of same AIDS virus." Nature **313**(6004): 636-637.
- Rausch, J. W. and S. F. Le Grice (2004). "'Binding, bending and bonding': polypurine tract-primed initiation of plus-strand DNA synthesis in human immunodeficiency virus." Int J Biochem Cell Biol **36**(9): 1752-1766.
- Razonable, R. R. (2011). "Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus." Mayo Clin Proc **86**(10): 1009-1026.
- Regoes, R. R. and S. Bonhoeffer (2005). "The HIV coreceptor switch: a population dynamical perspective." Trends Microbiol **13**(6): 269-277.
- Ren, J. and D. K. Stammers (2005). "HIV reverse transcriptase structures: designing new inhibitors and understanding mechanisms of drug resistance." Trends Pharmacol Sci **26**(1): 4-7.
- Ren, J. and D. K. Stammers (2008). "Structural basis for drug resistance mechanisms for non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase." Virus Res **134**(1-2): 157-170.
- Rey, O., J. Canon and P. Krogstad (1996). "HIV-1 Gag protein associates with F-actin present in microfilaments." Virology **220**(2): 530-534.

Rezvani, M., G. Ross, G. M. Morris, A. Bywaters, J. H. Wilkinson and J. W. Hopewell (1999). "How valid is the assumption of equal effect per fraction?" Radiother Oncol **53**(3): 227-231.

Richman, D. D. and S. A. Bozzette (1994). "The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression." J Infect Dis **169**(5): 968-974.

Rimsky, L. T., D. C. Shugars and T. J. Matthews (1998). "Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides." J Virol **72**(2): 986-993.

Rittinger, K., G. Divita and R. S. Goody (1995). "Human immunodeficiency virus reverse transcriptase substrate-induced conformational changes and the mechanism of inhibition by nonnucleoside inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 8046-8049.

Rizzuto, C. D., R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos, Y. Sun, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson and J. Sodroski (1998). "A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding." Science **280**(5371): 1949-1953.

Rossmann, M. G., E. Arnold, J. W. Erickson, E. A. Frankenger, J. P. Griffith, H. J. Hecht, J. E. Johnson, G. Kamer, M. Luo, A. G. Mosser and et al. (1985). "Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses." Nature **317**(6033): 145-153.

Rosta, E., M. Nowotny, W. Yang and G. Hummer (2011). "Catalytic mechanism of RNA backbone cleavage by ribonuclease H from quantum mechanics/molecular mechanics simulations." J Am Chem Soc **133**(23): 8934-8941.

Rous, P. (1911). "A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells." J Exp Med **13**(4): 397-411.

Ryzhova, E. V., P. Crino, L. Shawver, S. V. Westmoreland, A. A. Lackner and F. Gonzalez-Scarano (2002). "Simian immunodeficiency virus encephalitis: analysis of envelope sequences from individual brain multinucleated giant cells and tissue samples." Virology **297**(1): 57-67.

Sala, M., S. Wain-Hobson and F. Schaeffer (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase tG:T mispair formation on RNA and DNA templates with mismatched primers: a kinetic and thermodynamic study." EMBO J **14**(18): 4622-4627.

Sarafianos, S. G., K. Das, A. D. Clark, Jr., J. Ding, P. L. Boyer, S. H. Hughes and E. Arnold (1999). "Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 10027-10032.

Sarafianos, S. G., K. Das, C. Tantillo, A. D. Clark, Jr., J. Ding, J. M. Whitcomb, P. L. Boyer, S. H. Hughes and E. Arnold (2001). "Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase in complex with a polypurine tract RNA:DNA." EMBO J **20**(6): 1449-1461.

Sarafianos, S. G., B. Marchand, K. Das, D. M. Himmel, M. A. Parniak, S. H. Hughes and E. Arnold (2009). "Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition." J Mol Biol **385**(3): 693-713.

Schafer, W., W. G. Friebe, H. Leinert, A. Mertens, T. Poll, W. von der Saal, H. Zilch, B. Nuber and M. L. Ziegler (1993). "Non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase: molecular modeling and X-ray structure investigations." J Med Chem **36**(6): 726-732.

Schinazi, R. F., A. McMillan, D. Cannon, R. Mathis, R. M. Lloyd, A. Peck, J. P. Sommadossi, M. St Clair, J. Wilson, P. A. Furman and et al. (1992). "Selective inhibition of human immunodeficiency viruses by racemates and enantiomers of cis-5-fluoro-1-[2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]cytosine." Antimicrob Agents Chemother **36**(11): 2423-2431.

Schinazi, R. F., R. Sijbesma, G. Srdanov, C. L. Hill and F. Wudl (1993). "Synthesis and virucidal activity of a water-soluble, configurationally stable, derivatized C60 fullerene." Antimicrob Agents Chemother **37**(8): 1707-1710.

Schuurman, R., M. Nijhuis, R. van Leeuwen, P. Schipper, D. de Jong, P. Collis, S. A. Danner, J. Mulder, C. Loveday, C. Christopherson and et al. (1995). "Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC)." J Infect Dis **171**(6): 1411-1419.

Sharova, N., C. Swingle, M. Sharkey and M. Stevenson (2005). "Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans." EMBO J **24**(13): 2481-2489.

Shaw-Reid, C. A., V. Munshi, P. Graham, A. Wolfe, M. Witmer, R. Danzeisen, D. B. Olsen, S. S. Carroll, M. Embrey, J. S. Wai, M. D. Miller, J. L. Cole and D. J. Hazuda (2003). "Inhibition of HIV-1 ribonuclease H by a novel diketo acid, 4-[5-(benzoylamino)thien-2-yl]-2,4-dioxobutanoic acid." J Biol Chem **278**(5): 2777-2780.

Shewach, D. S., D. C. Liotta and R. F. Schinazi (1993). "Affinity of the antiviral enantiomers of oxathiolane cytosine nucleosides for human 2'-deoxycytidine kinase." Biochem Pharmacol **45**(7): 1540-1543.

Shioda, T. and H. Shibuta (1990). "Production of human immunodeficiency virus (HIV)-like particles from cells infected with recombinant vaccinia viruses carrying the gag gene of HIV." Virology **175**(1): 139-148.

Simmons, G., D. Wilkinson, J. D. Reeves, M. T. Dittmar, S. Beddows, J. Weber, G. Carnegie, U. Desselberger, P. W. Gray, R. A. Weiss and P. R. Clapham (1996). "Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry." J Virol **70**(12): 8355-8360.

Simpson, D. M. and M. Tagliati (1995). "Nucleoside analogue-associated peripheral neuropathy in human immunodeficiency virus infection." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **9**(2): 153-161.

Skillman, A. G., K. W. Maurer, D. C. Roe, M. J. Stauber, D. Eargle, T. J. Ewing, A. Muscate, E. Davioud-Charvet, M. V. Medaglia, R. J. Fisher, E. Arnold, H. Q. Gao, R. Buckheit, P. L. Boyer, S. H. Hughes, I. D. Kuntz and G. L. Kenyon (2002). "A novel mechanism for inhibition of HIV-1 reverse transcriptase." Bioorg Chem **30**(6): 443-458.

Sluis-Cremer, N., D. Arion and M. A. Parniak (2002). "Destabilization of the HIV-1 reverse transcriptase dimer upon interaction with N-acyl hydrazone inhibitors." Mol Pharmacol **62**(2): 398-405.

Sluis-Cremer, N. and G. Tachedjian (2008). "Mechanisms of inhibition of HIV replication by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors." Virus Res **134**(1-2): 147-156.

Sluis-Cremer, N., N. A. Temiz and I. Bahar (2004). "Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding." Curr HIV Res **2**(4): 323-332.

Smith, B. A., S. Gartner, Y. Liu, A. S. Perelson, N. I. Stilianakis, B. F. Keele, T. M. Kerkering, A. Ferreira-Gonzalez, A. K. Szakal, J. G. Tew and G. F. Burton (2001). "Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells." J Immunol **166**(1): 690-696.

Smith, R. A., L. A. Loeb and B. D. Preston (2005). "Lethal mutagenesis of HIV." Virus Res **107**(2): 215-228.

Sohl, C. D., K. Singh, R. Kasiviswanathan, W. C. Copeland, H. Mitsuya, S. G. Sarafianos and K. S. Anderson (2012). "Mechanism of interaction of human mitochondrial DNA polymerase gamma with the novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine indicates a low potential for host toxicity." Antimicrob Agents Chemother **56**(3): 1630-1634.

Squires, K. E. (2001). "An introduction to nucleoside and nucleotide analogues." Antivir Ther **6 Suppl 3**: 1-14.

Srivastava, S., N. Sluis-Cremer and G. Tachedjian (2006). "Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase as an antiviral target." Curr Pharm Des **12**(15): 1879-1894.

Stuchell, M. D., J. E. Garrus, B. Muller, K. M. Stray, S. Ghaffarian, R. McKinnon, H. G. Krausslich, S. G. Morham and W. I. Sundquist (2004). "The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding." J Biol Chem **279**(34): 36059-36071.

Tachedjian, G., D. J. Hooker, A. D. Gurusinge, H. Bazmi, N. J. Deacon, J. Mellors, C. Birch and J. Mills (1995). "Characterisation of foscarnet-resistant strains of human immunodeficiency virus type 1." Virology **212**(1): 58-68.

Tachedjian, G., M. Orlova, S. G. Sarafianos, E. Arnold and S. P. Goff (2001). "Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors are chemical enhancers of dimerization of the HIV type 1 reverse transcriptase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7188-7193.

Tang, J., K. Maddali, C. D. Dreis, Y. Y. Sham, R. Vince, Y. Pommier and Z. Wang (2011). "6-Benzoyl-3-hydroxypyrimidine-2,4-diones as dual inhibitors of HIV reverse transcriptase and integrase." Bioorg Med Chem Lett **21**(8): 2400-2402.

Tang, J., K. Maddali, C. D. Dreis, Y. Y. Sham, R. Vince, Y. Pommier and Z. Wang (2011). "N-3 Hydroxylation of Pyrimidine-2,4-diones Yields Dual Inhibitors of HIV Reverse Transcriptase and Integrase." ACS Med Chem Lett **2**(1): 63-67.

Tatyana, K., E. Francesca, Z. Luca, F. Giovanni, Y. C. Cheng, E. D. Ginger and T. Enzo (2009). "Inhibition of HIV-1 ribonuclease H activity by novel frangula-emodine derivatives." Med Chem **5**(5): 398-410.

Telesnitsky, A. and S. P. Goff (1997). "Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA."

Tersmette, M., R. E. de Goede, B. J. Al, I. N. Winkel, R. A. Gruters, H. T. Cuypers, H. G. Huisman and F. Miedema (1988). "Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex." J Virol **62**(6): 2026-2032.

Thali, M., A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh, J. Sodroski and H. G. Gottlinger (1994). "Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions." Nature **372**(6504): 363-365.

Thibault, S., M. Imbeault, M. R. Tardif and M. J. Tremblay (2009). "TLR5 stimulation is sufficient to trigger reactivation of latent HIV-1 provirus in T lymphoid cells and activate virus gene expression in central memory CD4+ T cells." Virology **389**(1-2): 20-25.

Tramontano, E. (2006). "HIV-1 RNase H: recent progress in an exciting, yet little explored, drug target." Mini Rev Med Chem **6**(6): 727-737.

Tramontano, E. and R. Di Santo (2010). "HIV-1 RT-associated RNase H function inhibitors: Recent advances in drug development." Curr Med Chem **17**(26): 2837-2853.

Tramontano, E., F. Esposito, R. Badas, R. Di Santo, R. Costi and P. La Colla (2005). "6-[1-(4-Fluorophenyl)methyl-1H-pyrrol-2-yl]-2,4-dioxo-5-hexenoic acid ethyl ester a novel diketo acid derivative which selectively inhibits the HIV-1 viral replication in cell culture and the ribonuclease H activity in vitro." Antiviral Res **65**(2): 117-124.

Tramontano, E., T. Kharlamova, L. Zinzula and F. Esposito (2011). "Effects of new quinizarin derivatives on both HCV NS5B RNA polymerase and HIV-1 reverse transcriptase associated ribonuclease H activities." J Chemother **23**(5): 273-276.

Tramontano, E., G. Piras, J. W. Mellors, M. Putzolu, H. Z. Bazmi and P. La Colla (1998). "Biochemical characterization of HIV-1 reverse transcriptases encoding mutations at amino acid residues 161 and 208 involved in resistance to phosphonoformate." Biochem Pharmacol **56**(12): 1583-1589.

Tsibris, A. M. and M. S. Hirsch (2010). "Antiretroviral therapy in the clinic." J Virol **84**(11): 5458-5464.

Tu, X., K. Das, Q. Han, J. D. Bauman, A. D. Clark, Jr., X. Hou, Y. V. Frenkel, B. L. Gaffney, R. A. Jones, P. L. Boyer, S. H. Hughes, S. G. Sarafianos and E. Arnold (2010). "Structural basis of HIV-1 resistance to AZT by excision." Nat Struct Mol Biol **17**(10): 1202-1209.

Valentin, A. and G. N. Pavlakis (2003). "Natural killer cells are persistently infected and resistant to direct killing by HIV-1." Anticancer Res **23**(3A): 2071-2075.

Vella, S. (1995). "Protease inhibitors and nucleosides: how many? when? An interview with Stefano Vella, MD. Interview by Mark Mascolini." J Int Assoc Physicians AIDS Care **1**(11): 12-18.

Vermeire, K., J. Brouwers, Y. Van Herrewege, R. Le Grand, G. Vanham, P. Augustijns, T. W. Bell and D. Schols (2008). "CADA, a potential anti-HIV microbicide that specifically targets the cellular CD4 receptor." Curr HIV Res **6**(3): 246-256.

Vermeire, K., Y. Zhang, K. Princen, S. Hatse, M. F. Samala, K. Dey, H. J. Choi, Y. Ahn, A. Sodoma, R. Snoeck, G. Andrei, E. De Clercq, T. W. Bell and D. Schols (2002). "CADA inhibits human immunodeficiency virus and human herpesvirus 7 replication by down-modulation of the cellular CD4 receptor." Virology **302**(2): 342-353.

Wainberg, M. A., T. Mesplede and P. K. Quashie (2012). "The development of novel HIV integrase inhibitors and the problem of drug resistance." Curr Opin Virol **2**(5): 656-662.

Walch, H., J. Dienstmaier, G. Eder, R. Gutzler, S. Schlogl, T. Sirtl, K. Das, M. Schmittel and M. Lackinger (2011). "Extended two-dimensional metal-organic frameworks based on thiolate-copper coordination bonds." J Am Chem Soc **133**(20): 7909-7915.

Wang, L. Z., G. L. Kenyon and K. A. Johnson (2004). "Novel mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by a new non-nucleoside analog, KM-1." J Biol Chem **279**(37): 38424-38432.

Wang, Y. J., P. M. McKenna, R. Hrin, P. Felock, M. Lu, K. G. Jones, C. A. Coburn, J. A. Grobler, D. J. Hazuda, M. D. Miller and M. T. Lai (2010). "Assessment of the susceptibility of mutant HIV-1 to antiviral agents." J Virol Methods **165**(2): 230-237.

Waters, L. J., G. Moyle, S. Bonora, A. D'Avolio, L. Else, S. Mandalia, A. Pozniak, M. Nelson, B. Gazzard, D. Back and M. Boffito (2007). "Abacavir plasma pharmacokinetics in the absence and presence of atazanavir/ritonavir or lopinavir/ritonavir and vice versa in HIV-infected patients." Antivir Ther **12**(5): 825-830.

Weiss, R. A. (1993). "How does HIV cause AIDS?" Science **260**(5112): 1273-1279.

Witvrouw, M., B. Van Maele, J. Vercammen, A. Hantson, Y. Engelborghs, E. De Clercq, C. Pannecouque and Z. Debyser (2004). "Novel inhibitors of HIV-1 integration." Curr Drug Metab **5**(4): 291-304.

Wong, J. K., H. F. Gunthard, D. V. Havlir, Z. Q. Zhang, A. T. Haase, C. C. Ignacio, S. Kwok, E. Emini and D. D. Richman (1997). "Reduction of HIV-1 in blood and lymph nodes following potent antiretroviral therapy and the virologic correlates of treatment failure." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12574-12579.

Yanagita, H., E. Urano, K. Matsumoto, R. Ichikawa, Y. Takaesu, M. Ogata, T. Murakami, H. Wu, J. Chiba, J. Komano and T. Hoshino (2011). "Structural and biochemical study on the inhibitory activity of derivatives of 5-nitro-furan-2-carboxylic acid for RNase H function of HIV-1 reverse transcriptase." Bioorg Med Chem **19**(2): 816-825.

Yang, G., J. Wang, Y. Cheng, G. E. Dutschman, H. Tanaka, M. Baba and Y. C. Cheng (2008). "Mechanism of inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by a stavudine analogue, 4'-ethynyl stavudine triphosphate." Antimicrob Agents Chemother **52**(6): 2035-2042.

Yap, S. H., C. W. Sheen, J. Fahey, M. Zanin, D. Tyssen, V. D. Lima, B. Wynhoven, M. Kuiper, N. Sluis-Cremer, P. R. Harrigan and G. Tachedjian (2007). "N348I in the connection domain of HIV-1 reverse transcriptase confers zidovudine and nevirapine resistance." PLoS Med **4**(12): e335.

Young, S. D., S. F. Britcher, L. O. Tran, L. S. Payne, W. C. Lumma, T. A. Lyle, J. R. Huff, P. S. Anderson, D. B. Olsen, S. S. Carroll and et al. (1995). "L-743, 726 (DMP-266): a novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase." Antimicrob Agents Chemother **39**(12): 2602-2605.

Zack, J. A., A. M. Haislip, P. Krogstad and I. S. Chen (1992). "Incompletely reverse-transcribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle." J Virol **66**(3): 1717-1725.

Zelina, S., C. W. Sheen, J. Radzio, J. W. Mellors and N. Sluis-Cremer (2008). "Mechanisms by which the G333D mutation in human immunodeficiency virus type 1 Reverse transcriptase facilitates dual resistance to zidovudine and lamivudine." Antimicrob Agents Chemother **52**(1): 157-163.

Zerhouni, B., J. A. Nelson and K. Saha (2004). "CXCR4-dependent infection of CD8+, but not CD4+, lymphocytes by a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate." J Virol **78**(22): 12288-12296.

Zhan, P., X. Chen, D. Li, Z. Fang, E. De Clercq and X. Liu (2011). "HIV-1 NNRTIs: Structural diversity, pharmacophore similarity, and implications for drug design." Med Res Rev.

Zhan, P., X. Liu, Z. Li, C. Pannecouque and E. De Clercq (2009). "Design strategies of novel NNRTIs to overcome drug resistance." Curr Med Chem **16**(29): 3903-3917.

Zhang, H., B. Yang, R. J. Pomerantz, C. Zhang, S. C. Arunachalam and L. Gao (2003). "The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA." Nature **424**(6944): 94-98.

Zhang, Z. (1999). "Crystal growth." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11069-11070.

Zhu, P., E. Chertova, J. Bess, Jr., J. D. Lifson, L. O. Arthur, J. Liu, K. A. Taylor and K. H. Roux (2003). "Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15812-15817.

Résumé

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 VIH-1 est un rétrovirus responsable d'une pandémie ayant touché à ce jour plus de 34 millions de personnes et 25 millions en ont déjà été victimes. En dépit des grands progrès réalisés dans le développement de nouveaux médicaments visant à bloquer la réplication de ce virus, l'émergence rapide de souches virales mutantes résistantes impose de concevoir rapidement de nouvelles stratégies thérapeutiques antivirales. La Reverse Transcriptase (RT) du VIH-1 joue un rôle majeur dans le cycle viral puisqu'elle est responsable de la conversion de l'ARN génomique simple brin en ADN double brins afin d'intégrer l'ADN génomique de la cellule hôte. La forme biologique de la RT est un hétérodimère formé de la sous unité p66 et de la sous unité p51. Les sous unités sont constituées des sous domaines fingers, palm, connexion, thumb et RNase H, ce dernier étant absent sur la sous unité p51. L'activation de la RT est un processus en deux étapes : la première étape consiste en l'association rapide des deux sous unités, suivie d'une deuxième étape plus lente, correspondant à des changements conformationnels fins à l'interface p66/p51.

Dans le but d'inhiber la fonction de la RT, nous avons proposé une nouvelle stratégie fondée sur l'utilisation des peptides interfaciaux courts dérivant de séquences hautement conservées de la RT, capables de cibler efficacement les interactions protéine/protéine et de bloquer la dimérisation et l'activation par maturation de la RT. La dimérisation des deux sous unités p51 et p66 implique leur interaction via les domaines de connexion. Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons criblé et isolé des peptides capables d'interférer avec cette interaction impliquant un « cluster » de résidus aromatiques (W). Nous avons identifié un peptide court P_{ID4} , et démontré que ce peptide induit un changement de conformation de la RT, entraînant la dissociation du complexe. La maturation implique l'interaction de résidus localisés au niveau de "hot spots" dans le domaine RNase H de p66 et thumb de p51. Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons sélectionné un peptide court, P27, issu du domaine thumb pouvant inhiber l'étape de la "maturation" (P27). Ces deux classes de peptides bloquent la réplication virale et sont efficaces sur plusieurs souches virales et sur des mutants résistants aux NNRTIs et NRTIs.

Les résultats obtenus sur nos deux classes d'inhibiteurs peptidiques démontrent que la dimérisation et la maturation de la RT constituent des cibles de choix pour bloquer l'activité polymérase de la RT et ainsi stopper la prolifération virale. Dans cette optique le ciblage des domaines hautement conservés via des peptides relativement modulables constitue une nouvelle approche extrêmement prometteuse vis à vis de l'apparition de mutation de résistance.

Résumé

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 VIH-1 est un rétrovirus responsable d'une pandémie ayant touché à ce jour plus de 34 millions de personnes et 25 millions en ont déjà été victimes. En dépit des grands progrès réalisés dans le développement de nouveaux médicaments visant à bloquer la réplication de ce virus, l'émergence rapide de souches virales mutantes résistantes impose de concevoir rapidement de nouvelles stratégies thérapeutiques antivirales. La Reverse Transcriptase (RT) du VIH-1 joue un rôle majeur dans le cycle viral puisqu'elle est responsable de la conversion de l'ARN génomique simple brin en ADN double brins afin d'intégrer l'ADN génomique de la cellule hôte. La forme biologique de la RT est un hétérodimère formé de la sous unité p66 et de la sous unité p51. Les sous unités sont constituées des sous domaines fingers, palm, connexion, thumb et RNase H, ce dernier étant absent sur la sous unité p51. L'activation de la RT est un processus en deux étapes : la première étape consiste en l'association rapide des deux sous unités, suivie d'une deuxième étape plus lente, correspondant à des changements conformationnels fins à l'interface p66/p51.

Dans le but d'inhiber la fonction de la RT, nous avons proposé une nouvelle stratégie fondée sur l'utilisation des peptides interfaciaux courts dérivant de séquences hautement conservées de la RT, capables de cibler efficacement les interactions protéine/protéine et de bloquer la dimérisation et l'activation par maturation de la RT. La dimérisation des deux sous unités p51 et p66 implique leur interaction via les domaines de connexion. Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons criblé et isolé des peptides capables d'interférer avec cette interaction impliquant un « cluster » de résidus aromatiques (W). Nous avons identifié un peptide court P_{ID4} , et démontré que ce peptide induit un changement de conformation de la RT, entraînant la dissociation du complexe. La maturation implique l'interaction de résidus localisés au niveau de "hot spots" dans le domaine RNase H de p66 et thumb de p51. Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons sélectionné un peptide court, P27, issu du domaine thumb pouvant inhiber l'étape de la "maturation" (P27). Ces deux classes de peptides bloquent la réplication virale et sont efficaces sur plusieurs souches virales et sur des mutants résistants aux NNRTIs et NRTIs.

Les résultats obtenus sur nos deux classes d'inhibiteurs peptidiques démontrent que la dimérisation et la maturation de la RT constituent des cibles de choix pour bloquer l'activité polymérase de la RT et ainsi stopper la prolifération virale. Dans cette optique le ciblage des domaines hautement conservés via des peptides relativement modulables constitue une nouvelle approche extrêmement prometteuse vis à vis de l'apparition de mutation de résistance.

Annexes

I Figures Complémentaires :

Les K_i sont obtenus grâce à la représentation de Dixon $1/V = f([\text{peptide}])$

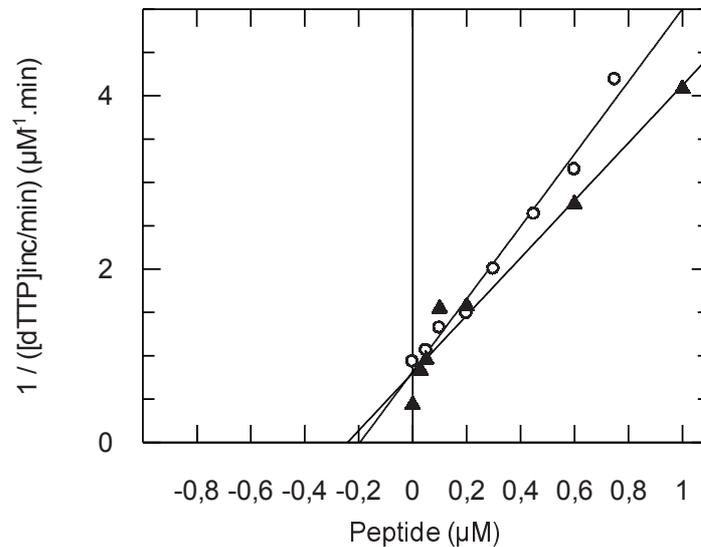


Figure 1 : Représentation de Dixon de l'inhibition de l'activité polymérase de la RT par les peptides **Pep7** (▲ $K_i = 0.24 \pm 0.1 \mu M$) et **P_{1D4}** (○ $K_i = 0.17 \pm 0.09 \mu M$). Les constantes d'inhibitions ont pu être mesurées dans un test standard de l'activité polymérase de la RT décrit dans la partie « Méthodes »

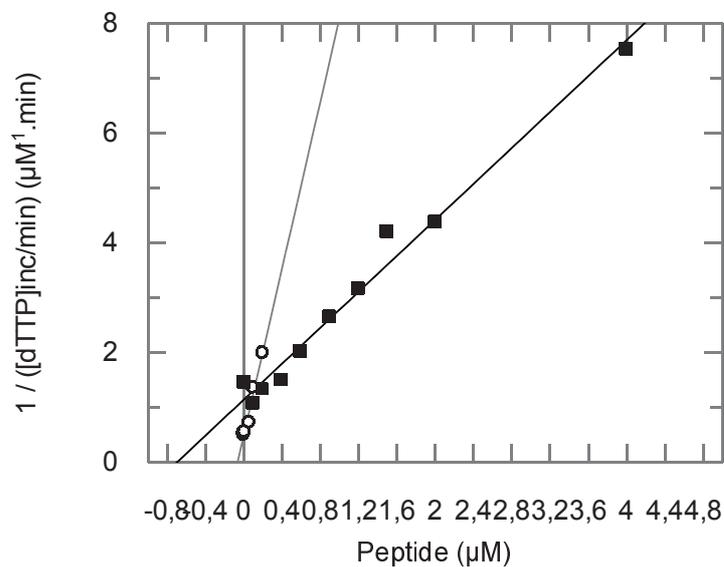


Figure 2 : Représentation de Dixon de l'inhibition de l'activité polymérase de la RT par les peptides **Paw** (■ $K_i = 0.7 \pm 0.2 \mu M$) et **P27** (○ $K_i = 0.045 \pm 0.05 \mu M$)

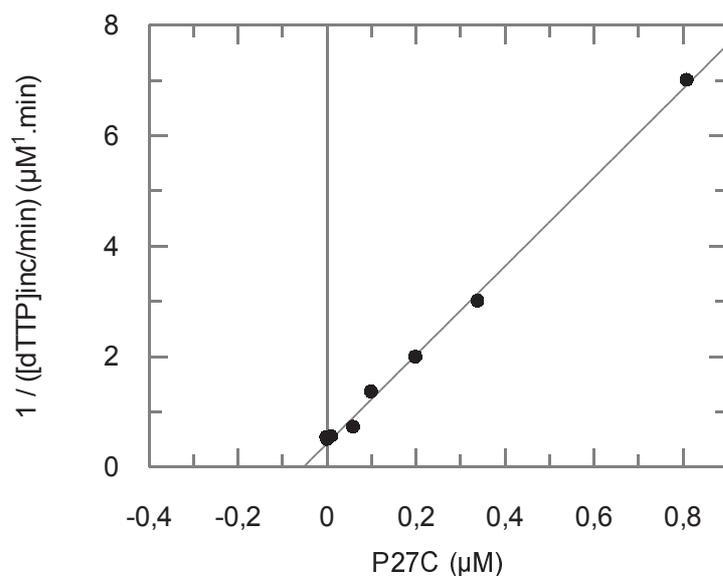


Figure 3 : Représentation de Dixon de l'inhibition de l'activité polymérase de la RT par les peptides P27C ($K_i = 0.05 \pm 0.007 \mu\text{M}$)

II Publications

Article 1: Insight into the mechanism of peptide-based inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase maturation.

Daouda Abba-Moussa¹, , Audrey Agopian¹, Gudrun Aldrian-Herrada¹, Yvan Boublick¹, Raymond Schinazi², Pascal Clayette³, & Gilles Divita^{1*}. En revision chez JBC