

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PROVENCE
AIX-MARSEILLE I**

Spécialité :

Bioinformatique, Biochimie structurale et génomique

Par

Fabrice GASTON

**Développement d'inhibiteurs d'entrée du virus
VIH-1**

Dirigée par :

Pr. ELMOSTAFA BAHRAOUI

Soutenue le 15 décembre 2008 devant le Jury composé de :

Dr Hakim Hocini

Dr Francisco Veas

Pr Elmostafa Bahraoui

Dr Hervé Darbon

Pr Ernest Giralt

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

Codirecteur de thèse

Examineur

Préparée à l'université Paul Sabatier. Laboratoire d'immuno-virologie, UFR SVT, Bât 4R3.

118, route de Narbonne. 31062 Toulouse Cedex.

Je dédie cette thèse à mes parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Elmostafa Bahraoui qui m'a chaleureusement accueilli dans son laboratoire et m'a permis de réaliser cette thèse. Merci de votre soutien, de votre aide et de vos conseils scientifiques.

Je remercie également vivement ceux qui ont partagé avec moi cette dure mais mémorable expérience de thèse. Kaoutar et Xavier, cela a été un plaisir de partager ces moments avec vous.

Merci à Fabienne et Cécile pour leur soutien moral durant cette dernière année de thèse.

Je n'oublie pas Yvan qui fut d'une aide technique précieuse. Merci à toi d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin et merci de m'avoir accordé ton amitié.

Merci également à tous les membres du labo, passé et présent, pour votre bonne humeur et l'aide apportée. Jean-Michel, Emeline, Sylvia, Simon, Virginie(s), Olfa, Nawal, Pierre, Nathalie, Rémi, Yamina, Bouchaib, je ne vous oublierai pas.

Résumé

La première étape du cycle viral du virus de l'immunodéficience humaine se déroule grâce à l'interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe gp120/gp41 et les récepteurs CD4 et CCR5/CXCR4. Les différentes fonctions activées par cette étape, incluant l'attachement, la pénétration et la signalisation cellulaire représentent des cibles potentielles pour le développement d'antirétroviraux.

Dans ce travail, nous avons développé des approches permettant d'agir sur chacune de ces étapes à l'aide de peptides synthétiques, d'anticorps anti-peptide et d'inhibiteurs des voies de signalisation.

Dans la première approche, nous nous sommes intéressé au développement d'analogues peptidiques de la région HRII en évitant les limitations, incluant courte demi-vie et émergence d'isolats de résistance, rencontrées lors de l'utilisation du peptide T-20 (Fuzeon®). Nous avons synthétisé un peptide de 34 acides aminés modélisant la région HRII en incluant des acides aminés non naturels de série D uniquement au niveau de certains sites sensibles à la protéolyse ou dans la totalité de la séquence. Les résultats obtenus montrent que les modifications ponctuelles permettent de : i) maintenir la structure en hélice α du peptide, ii) maintenir sa capacité à interagir avec la région HRI, iii) d'augmenter sa demie-vie et iv) de conserver son activité antivirale.

Dans la deuxième approche, nous avons testé la capacité des peptides analogues de la région HRII de VIH-1 et de la boucle V3 de SIV à induire la production d'anticorps neutralisants. Cette étude nous a permis d'aboutir à deux conclusions principales : i) les anticorps anti-HRII peuvent interférer avec l'activité antivirale du peptide administré lors du traitement antiviral, ii) contrairement aux anticorps anti-V3 du VIH-1, les anticorps anti-V3 de SIV sont incapables de neutraliser le virus SIV suggérant des fonctions différentes pour cette région chez HIV-1 et SIV.

Dans la troisième partie, nous avons montré que l'attachement du virus VIH sur son récepteur s'accompagne de l'activation de la voie PKC dont l'isoforme PKC- δ . L'inhibition de cet isoforme bloque totalement la réplication virale. Ce blocage semble s'opérer en interférant avec les étapes post-entrée du virus en inhibant la formation des pseudopodes et des filaments d'actine, structure nécessaire pour l'étape de la transcription inverse.

Summary

The first step of HIV-1 replication cycle is mediated by the interaction of gp120/gp41 glycoproteins with CD4/CCR5/CXCR4 receptors. The different consequences deriving from this step, including virion attachment, entry and cell signaling represent potential targets for antiretroviral development.

In this work, different ways using synthetic peptides, anti-peptide antibodies and cell signaling inhibitors were developed.

A first approach focused on development of gp41 HRII peptidic analogs without the limitations observed for T20 as a short half-life and virus resistances appearance. A 34 amino acid peptide mimicking gp41 HRII region was synthesised by introducing mutations on amino acids localized at potential protease cleavage sites. L-amino acids at these positions were replaced by their D isomers. Results showed that these peptides still folded in alpha helical structure, could interact with the HRI region, did have increased half-life and conserved their antiviral activity.

In a second step, we studied the capacity of peptides mimicking HIV-1 HRII region and SIV V3 loop to induce production of neutralizing antibodies. These results showed that antibodies against HRII region could inhibit peptide antiviral activity. In contrast, antibodies induced against SIV V3 loop were not able to neutralize SIV replication.

In the last part, we showed that activation of PKC pathway followed the interaction of HIV with his cell receptor. The inhibition of PKC- δ isoform totally inhibited HIV-1 replication. This inhibition was the consequence of the interruption of pseudopode formation and cytoskeleton reorganisation which are two components essential for reverse transcription.

Sommaire

CHAPITRE I	10
I - LES VIRUS ET RETROVIRUS :	11
II - CLASSIFICATION DES RETROVIRUS :	11
III - ANALYSE DU GENOME DES RETROVIRUS:	14
A - Les régions non codantes :	14
B - Les régions codantes :	15
IV - LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE OU VIH.....	17
A - Structure et génome du VIH-1	18
1 - Protéines de structure	20
a – La protéine Gag	20
b – La protéine Pol	20
c – La protéine Env	21
2 - Protéines de régulation.....	23
a – La protéine Tat	23
b – La protéine Rev	24
c – La protéine Nef.....	25
d – La protéine Vpu.....	26
f – La protéine Vpr	27
g – La protéine Vif	27
B - Cycle de réplication du VIH-1	28
1 - Fixation du virus sur les cellules cibles	29
2- Mode d'entrée du virus	29
3- Transcription inverse	30
4- Intégration	33

5- Expression du génome viral et production des particules virales	33
C- Pathogénèse du VIH.....	35
1- Variabilité du VIH	35
2- Transmission du VIH :.....	37
a - Primo infection.....	38
b - Latence	38
c - Stade SIDA.....	39
3- Facteurs impliqués dans la progression de la maladie	39
4- Cellules cibles du VIH	40
5- Traitements/résistance.....	41
a - Approches pharmacologiques	41
a-1 - Interaction virus-cellule cible	41
a-2 - Transcription inverse	42
Les analogues nucléosidiques	42
Les analogues non nucléosidiques	43
a-3 - Intégration	43
a-4 - Maturation.....	44
a-5 - Protéines de régulation.....	45
b - Approche utilisant les ARN interférants	45
c - Approche immunologique.....	47
V - LE VIH- 2	51
VI - LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE SIMIENNE (VIS)	51

CHAPITRE II.....	52
I - PROTEINES IMPLIQUEES DANS LE MECANISME DE FUSION.....	53
A - Protéines virales	53
1 – La protéine Env	53
2 – La protéine gp120.....	54
3 – La protéine gp41.....	56
B- Protéines cellulaires de l’hôte	57
1 – Le récepteur CD4	58
2 - Les récepteurs aux chimiokines	59
a - Le CCR5	61
b - Le CXCR4.....	63
II- ETAPE D’ENTREE DU VIH-1.....	64
A - Attachement gp120-CD4	64
B - Interaction gp120/CCR5 ou CXCR4.....	67
C- Mécanisme de fusion/rôle de la gp41	67
CHAPITRE III	72
I - LES ANTICORPS	73
II - INHIBITEURS CHIMIQUES.....	75
III - INHIBITEURS PEPTIDIQUES	82
A - Peptides dérivés du CD4	82
B - Peptides dérivés des chimiokines	82
C - Peptides dérivés de la gp41	83

OBJECTIFS.....	87
ARTICLE 1	91
DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF PEPTIDIC FUSION INHIBITORS DERIVED FROM HIV-1 GP41 WITH PARTIAL D-AMINO ACID SUBSTITUTIONS	91
ARTICLE 2	130
ANTIBODIES AGAINST HIV-1 GP41 HR11 PEPTIDES DOWN MODULATE THE DIRECT INHIBITORY EFFECT OF THESE PEPTIDES.....	130
ARTICLE 3	159
ANTIGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF V3 REGION OF SIVMAC ENVELOPE GLYCOPROTEIN: EFFECT OF THE LINEAR AND CIRCULAR STRUCTURE ON THE GENERATION OF NEUTRALIZING ANTIBODIES	159
ARTICLE 4	190
PKC-DELTA IS REQUIRED IN HUMAN MACROPHAGES FOR COMPLETION OF HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTION	190
ANNEXE.....	218
DISCUSSION	225
REFERENCES	235

Chapitre I

Rappels et introduction

I - Les virus et rétrovirus :

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires qui détournent à leur profit les machineries cellulaires pour la réalisation de leur cycle de réplication. Le développement de stratégies antivirales nécessite donc la compréhension des interactions du virus avec son hôte.

Parmi les virus on distingue les rétrovirus qui infectent spécifiquement les cellules eucaryotes. Ces derniers sont des virus enveloppés, de forme sphérique d'un diamètre de 80 à 100 nm. Ils contiennent deux molécules d'ARN de polarité positive constituées de 7000 à 12000 nucléotides. Cet ARN viral monocaténaire va être rétro-transcrit en ADN bicaténaire grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse. L'ADN double brin (db) viral est ensuite transporté dans le noyau où il s'intègre dans le génome cellulaire. La présence d'une activité transcriptase inverse est d'ailleurs une caractéristique des rétrovirus et c'est justement cette activité qui leur a donné ce nom. Après intégration, ces provirus peuvent s'exprimer ou rester sous forme de provirus chez l'hôte.

II - Classification des rétrovirus :

Les rétrovirus sont classés en 7 genres : les alpharétrovirus, les bêtarétrovirus, les deltarétrovirus, les gammarétrovirus, les epsilon-rétrovirus, les lentivirus et les spumavirus.

1/ Les Alpharétrovirus : ces virus infectent les oiseaux, comme *l'avian leucosis virus* ou encore le *Rous sarcoma virus*, mais aussi les rats. Ces virus sont oncogènes, ils peuvent induire des sarcomes et autres tumeurs mais également une anémie.

2/ Les Betarétrovirus : ce sont des virus qui infectent les souris et certains primates. Le plus connu est le *mouse mammary tumour virus*.

3/ Les Gammarétrovirus : ils infectent de nombreuses variétés de mammifères et sont également responsables de sarcomes et de leucémies. On y trouve le *Feline leukemia virus*, le *Murine leukemia virus*, le *Porcine type-C oncovirus* ou encore le *Woolly monkey sarcoma virus*.

4/ Les Deltarétrovirus : ils infectent les mammifères, notamment l'homme. Ils sont responsables de leucémies comme *l'Human T-lymphotropic virus 1 et 2* et de leucémies bovines par le *Bovine leukemia virus*.

5/ Les Epsilonrétrovirus : ces virus infectent les poissons. On y trouve le *Walleye dermal sarcoma virus* et le *Perch hyperplasia virus* notamment.

6/ Les Lentivirus : du latin *lentis* signifiant lent. Ce sont des virus qui infectent les mammifères. Ils sont caractérisés par une longue période d'incubation et ils sont tous cytopathogènes. Ils sont responsables d'atteintes du système nerveux, des poumons, des systèmes articulaires et des cellules hématopoïétiques. On y trouve les *Visna/maedi virus* qui provoquent des pneumonies chroniques chez la chèvre et de l'arthrite ainsi qu'une encéphalomyélite démyélinisante chez le mouton (Visna) conduisant à la paralysie de l'animal. On y trouve également le *Bovine immunodeficiency virus* (BIV), l'*Equine infectious anemia virus* (EIAV), le *Feline immunodeficiency virus* (FIV), ainsi que l'*Human immunodeficiency virus* (HIV ou VIH en français) et le *Simian immunodeficiency virus* (SIV).

7/ Les Spumavirus : du latin *spuma* (écume) infectent les mammifères de manière chronique sans entraîner de pathologie particulière chez leur hôte. Cette infection se caractérise toutefois par l'apparition de syncytium et de vacuoles donnant aux cellules un aspect spumeux ce qui explique leur nom. Malgré le fait qu'ils soient non pathogènes, ils semblent favoriser l'infection de l'hôte par d'autres virus et prédisposer l'organisme infecté à des maladies auto-immunes.

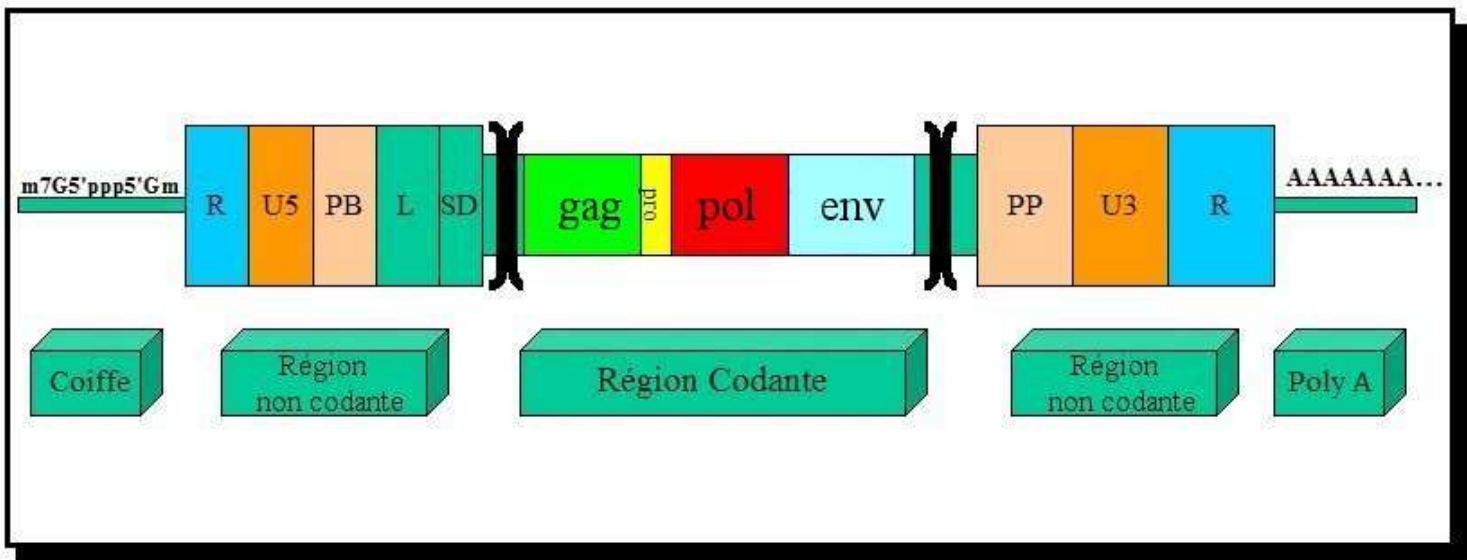
Tableau1 : classification des rétrovirus :

Genre	Exemple	Morphologie
Alpharétrovirus	Avian leukosis virus Rous sarcoma virus Avian myeloblastosis virus	Type C
Betarétrovirus	Mason-Pfizer monkey virus Simian retrovirus 1 & 2 Mouse mammary tumor virus Jaagsiekte sheep retrovirus Squirrel monkey retrovirus	Type B et D
Gammarétrovirus	Feline leukemia virus Murine leukemia virus Moloney murine leukemia virus Porcine type-C oncovirus Viper retrovirus	Type C
Deltarétrovirus	Bovine leukemia virus Human T-lymphotropic virus 1 & 2 Simian T-lymphotropic virus 3	
Epsilonrétrovirus	Walleye dermal sarcoma virus Perch hyperplasia virus Snakehead retrovirus	
Lentivirus	Bovine immunodeficiency virus Equine infectious anemia virus Feline immunodeficiency virus Visna/maedi virus Human immunodeficiency virus 1 & 2 Simian immunodeficiency virus	Sphérique
Spumavirus	African green monkey simian foamy virus Bovine foamy virus Equine foamy virus Feline foamy virus	Immature

III - Analyse du génome des rétrovirus:

Le génome des rétrovirus peut se diviser en deux régions distinctes, les régions codantes et les régions non codantes. Les régions non codantes, situées en 5' et en 3' (qui constitueront les LTR ou long terminal repeat au niveau du provirus) entourent les régions codantes comprenant entre autres les gènes *gag*, *pol* et *env* (figure 1).

Figure 1 : représentation schématique du génome rétroviral



A - Les régions non codantes :

On trouve, de 5' en 3' :

- Coiffe : correspond à la structure m7G5'ppp5'Gm que l'on trouve dans les ARNm des eucaryotes.
- R : pour « repeat » ou « redondant » car cette séquence répétée est aussi présente en 3'. Elle joue un rôle essentiel lors du premier saut du complexe de réplication.
- U5 : séquence unique en 5', longue d'une centaine de nucléotides, elle participe à la dimérisation de l'ARN.
- PB : primer binding site, long de 18 nucléotides, ce site va fixer un ARNt cellulaire par son extrémité 3' complémentaire créant ainsi le site d'initiation de la transcription inverse.

- L : leader, constitué de 300 nucléotides environ, il englobe la séquence d'encapsidation de l'ARN viral. Il participerait également à la stabilisation de l'ARNm à un niveau post transcriptionnel (Lenz, Scheid et al. 1997).
- SD : site donneur pour l'épissage de l'ARNm
- PP : poly purine, long de 10 à 20 nucléotides, elle joue un rôle important lors de l'initiation de la synthèse du second brin d'ADN.
- U3 : séquence unique en 3', longue de 200 à 800 nucléotides, elle englobe les régions « TATA box » et le site de polyadénylation.
- R : même région que celle trouvée en 5'.
- PolyA : de 100 à 200 Adénines comme pour les ARNm eucaryotes.

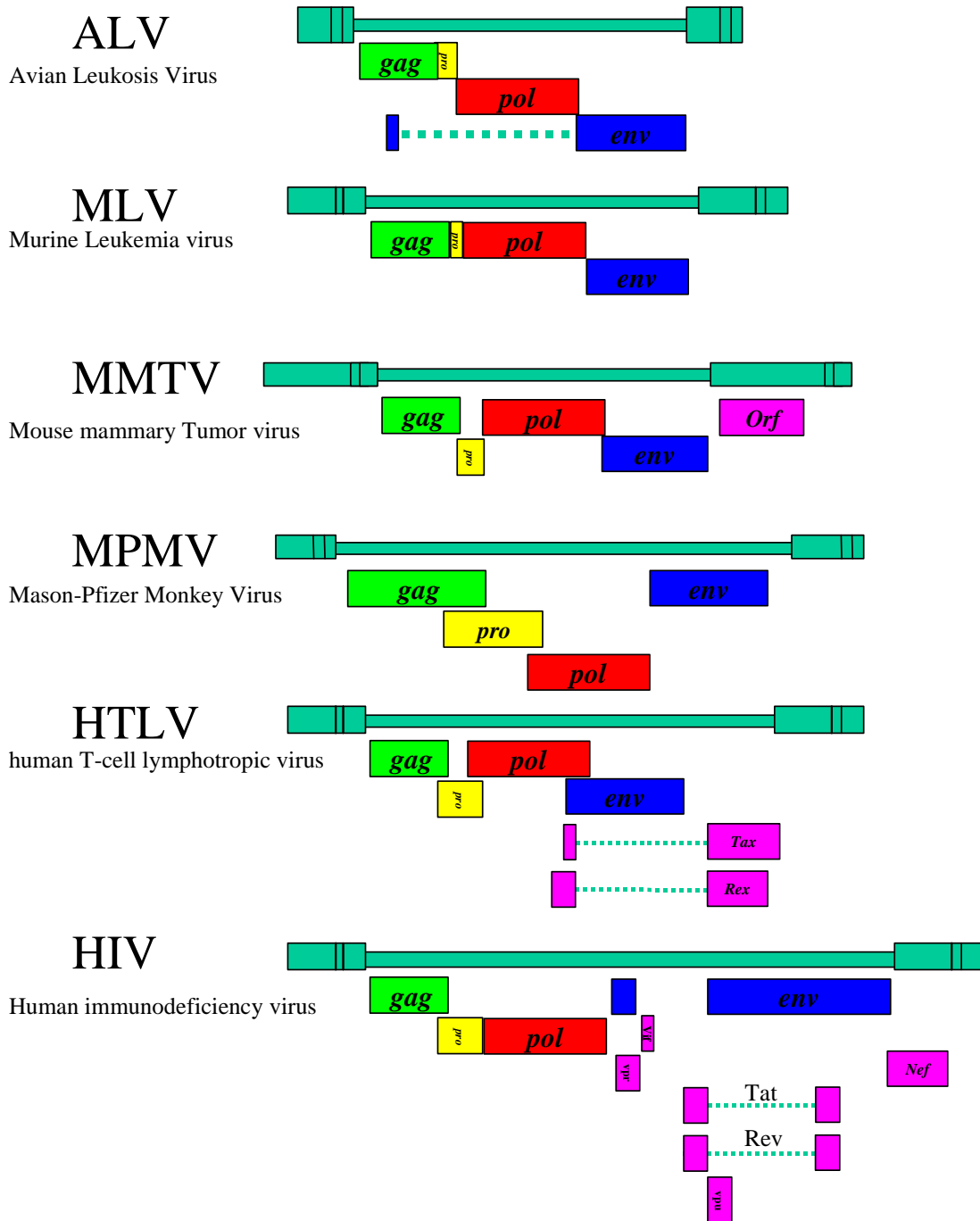
B - Les régions codantes :

Trois gènes essentiels sont retrouvés dans la région codante des rétrovirus.

- *gag* : il code pour un précurseur protéique qui est clivé par la protéase virale afin de donner les différentes protéines composant la structure interne du virus. Après clivage, ce précurseur donne les protéines de la matrice (MA), de la capsid (CA) et de la nucléocapsid (NC) capable de lier l'ARN viral.
- *pol* : il code pour les principales protéines enzymatiques virales qui vont permettre la réplication du virus. Il s'agit notamment de la transcriptase inverse (RT) qui va permettre la rétro transcription des brins d'ARN en ADN, de l'intégrase (IN) qui va induire l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire grâce au complexe d'intégration et de la protéase virale (PR) qui procède à la maturation des précurseurs Gag et Gag-Pol.
- *env* : il code pour les glycoprotéines d'enveloppe. Dans le cas du VIH-1, il code pour un précurseur protéique qui est une glycoprotéine, la gp160. Ce précurseur va être clivé par des protéases cellulaires en gp120 appelée protéine de surface (SU) et en gp41 appelée protéine transmembranaire (TM). Ces protéines sont primordiales car elles permettent la reconnaissance des cellules cibles par le virus.

Il est à noter que les virus SIV et VIH possèdent d'autres gènes codant pour des protéines de régulation comme *tat*, *rev*, *nef*, *vpu*, *vpr* et *vpx* (Figure 2).

Figure 2 : Variation dans l'organisation du génome des rétrovirus. Les rétrovirus simples contiennent principalement les gènes gag, pol et env alors que les rétrovirus complexes contiennent en plus des gènes accessoires.



IV - Le virus de l'immunodéficience humaine ou VIH

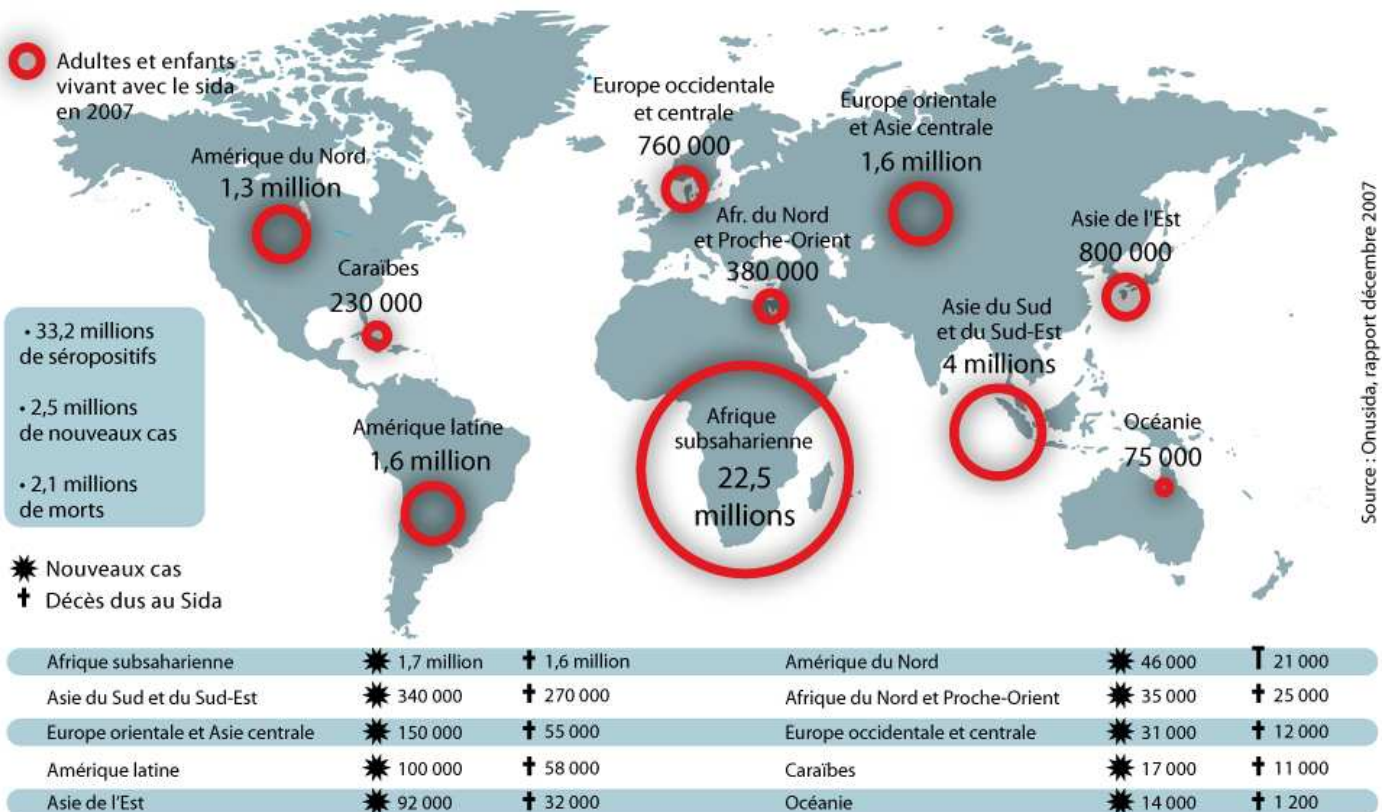
En 1981, le centre de contrôle des maladies infectieuses d'Atlanta (CDC) observe une augmentation non négligeable du nombre de cas d'infections opportunistes comme des pneumonies à *Pneumocystis carinii* et de nombreux sarcomes de Kaposi, maladies relativement rares en Amérique du nord et touchant en général des personnes immunodéprimées comme les sujets transplantés ayant reçu un traitement immunosuppresseur par exemple. D'autres pathologies sont venues s'associer à cette liste comme des pneumonies à CMV et une résurgence de Herpes Simplex Virus. Il s'avéra que toutes ces personnes, dans un premier temps, étaient des hommes jeunes et homosexuels mais d'autres populations comme les toxicomanes, se partageant des seringues, ou des hémophiles sont venus s'y ajouter incitant à penser que le mode de contamination par voie sexuelle n'était pas le seul en cause et que le sang pouvait également véhiculer l'agent infectieux.

Le terme de SIDA pour Syndrome de l'Immunodéficience Acquis a été ensuite adopté. Les premiers cas en France ont été recensés à partir de 1982. Robert Gallo émet alors l'hypothèse que le HTLV-1 (Human T-Cell Leukemia Virus) pourrait être l'agent responsable (Gelman, Popovic et al. 1983). L'équipe du Professeur Luc Montagnier parvient à isoler le virus à partir de lymphocytes de patients infectés en suivant la présence d'activité transcriptase inverse dans le surnageant viral (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983). Cependant, l'observation au microscope électronique montre qu'il s'agit d'une particule virale avec une structure différente de celle de l'HTLV-1. Ce virus est appelé LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) dans un premier temps par l'équipe française (Klatzmann, Champagne et al. 1984) et HTLV-3 par l'équipe de Gallo (Gallo, Sarin et al. 1983; Gallo, Salahuddin et al. 1984; Gallo and Wong-Staal 1985; Groopman, Chen et al. 1986). Des études ultérieures confirmeront que ces virus sont identiques. L'appellation VIH sera définitivement adoptée par l'ensemble de la communauté des virologistes. En 1986 un deuxième virus apparenté au VIH-1 a été isolé et appelé VIH-2 (Clavel, Guetard et al. 1986; Clavel, Mansinho et al. 1987).

Depuis sa découverte l'épidémie de SIDA a dramatiquement évolué, majoritairement en Afrique et en Asie et aucun vaccin efficace n'est à ce jour disponible. En 2007 environ 33,5 millions de personnes sont porteuses du virus, environ 2,7 millions de nouveaux cas ont été recensés cette année et à peu près 2 millions de morts (UNAIDS 2008).

Tous les continents sont touchés et on observe également une forte augmentation d'infection dans la population féminine ainsi qu'une recrudescence de contamination dans les pays d'Europe de l'est comme l'Ukraine (Figure 3).

Figure 3 : Répartition du nombre de séropositifs dans le monde en 2007. D'après UNAIDS 2007.



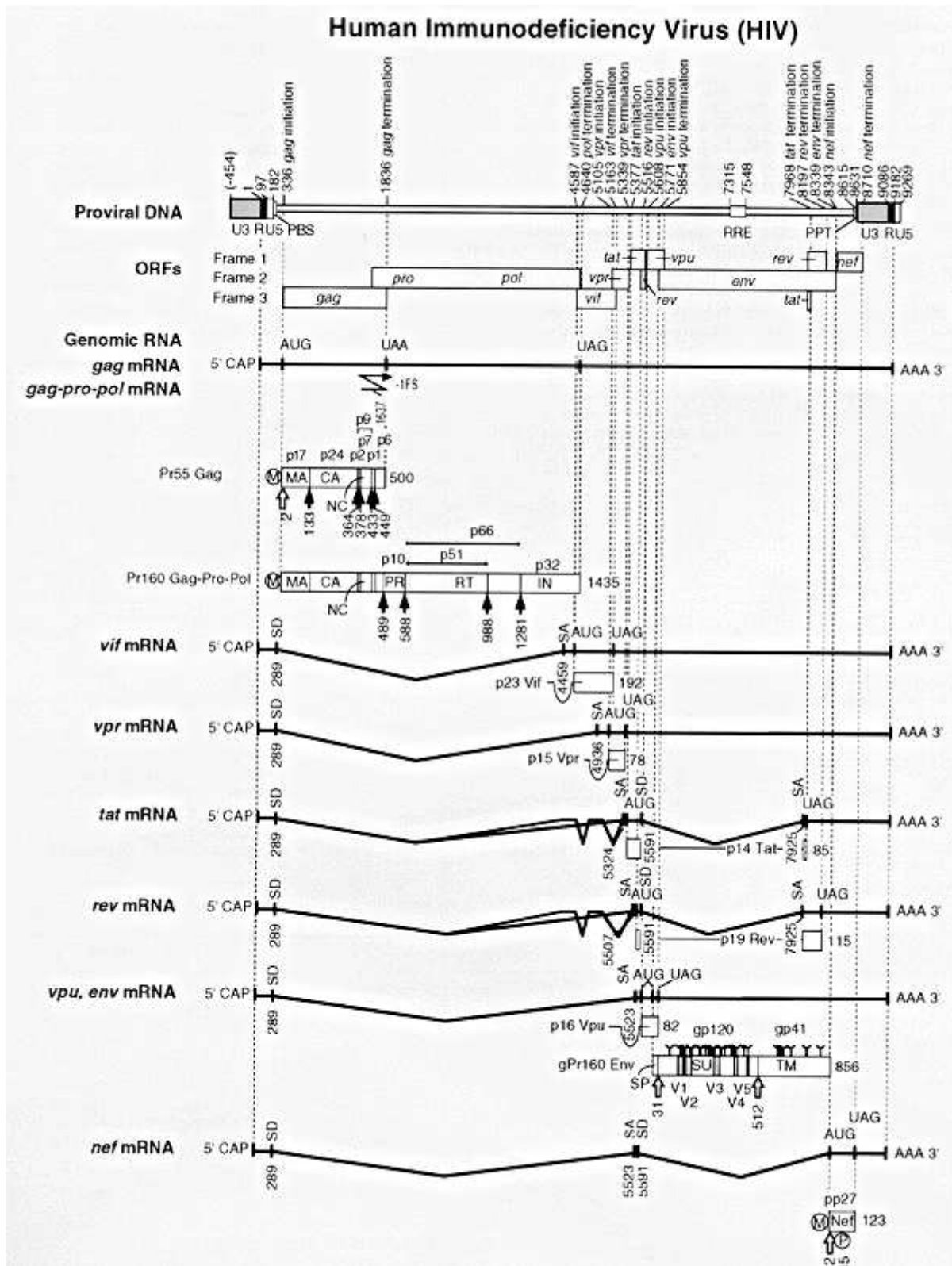
A - Structure et génome du VIH-1

Le génome du VIH a une taille de 9,8 kb et contient plusieurs gènes compris entre les régions non codantes en 5' et en 3'. En plus des gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env*, il contient une série de gènes codant pour des protéines régulatrices telles que Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr et Vpu (Figure 4).

Les régions non codantes situées en 5' et en 3' formeront les LTR au niveau du provirus. Ces LTR jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes viraux et par conséquent la réplication. La région 5' contient par exemple dans sa région U3 la « boîte

TATA » essentielle pour l'initiation de la transcription. Cette région contient également plusieurs sites de fixation de facteurs de transcription dont SP1 et NF- κ B. On y trouve également le site TAR (Tat Activation Region) au niveau de la région R. Ce site permet la fixation, sur l'ARN transcrit, de la protéine de régulation Tat qui est indispensable pour la réplication virale.

Figure 4 : Structure du génome du VIH-1, présentation du provirus et des différents ARN produits (Coffin, Hughes et al. 1997).



1 - Protéines de structure

a - Gag

Le gène *gag* code pour un précurseur protéique appelé Pr55^{Gag}. Ce précurseur est ensuite clivé par la protéase virale en différentes protéines qui constitueront la structure interne du virus :

- p17 : protéine myristylée constituant la matrice.
- p24 : protéine constituant le core. C'est une protéine utilisée également comme antigène dans les test ELISA pour dépister la présence du virus *in vitro* ou dans le plasma chez les patients lors de la primo infection.
- p16 : qui donnera les protéines p6 et p7 qui permettent l'interaction des ARN avec la capsid et ont un rôle essentiel dans la réplication virale au moment de l'étape d'encapsidation des ARN et de la protéine de régulation Vpr. De plus, p6 a un rôle majeur dans la formation des virions.

b – Pol

Il est exprimé sous forme d'un précurseur Gag-Pol. En effet dans le cas du VIH-1, un codon stop est présent à la fin du gène *gag*, mais, une fois sur vingt, il se produit un changement de phase de lecture qui rend silencieux le codon de terminaison permettant ainsi l'obtention du précurseur Pr160^{Gag-Pol}.

Le produit de *pol* code pour trois enzymes : protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase.

- La protéase virale p10 : elle est responsable de la maturation des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol}. C'est une aspartyl-protéase.
- La transcriptase inverse est un hétérodimère de deux sous unités p51/66 possédant une activité polymérase capable de synthétiser l'ADN en utilisant comme matrice de l'ARN ou de l'ADN. Elle présente en outre une activité RNaseH avec une activité exonucléase active sur l'ARN sous forme d'hybride ARN-ADN. L'activité RNase est portée par son extrémité C terminale et l'activité polymérase par son extrémité N-terminale. Elle est active aussi bien sur l'extrémité 5' que sur l'extrémité 3'.

- L'intégrase p31: c'est une protéine de 31 kDa. Son activité est essentielle pour l'intégration du génome viral rétrotranscrit dans l'ADN de la cellule cible.

c - Env

Le gène *env* code pour un précurseur de 90 kDa qui subit des modifications post-traductionnelles, dont la glycosylation, pour donner une glycoprotéine de 160 kDa. Cette protéine va être clivée par des protéases cellulaires comme la furine ou PC7 pour donner les deux protéines matures:

- gp120 : C'est elle qui, en interagissant avec les récepteurs cellulaires CD4 et les co-récepteurs CCR5 ou CXCR4 va initier le processus de fusion permettant au virus d'entrer dans la cellule. L'interaction avec le récepteur CD4 est de très forte affinité avec un Kd de l'ordre de 10^{-9} M. Il a été identifié sur cette protéine 5 domaines constants (C1 à C5) dont l'un contient le domaine d'interaction avec le CD4 et 5 domaines variables (V1 à V5). Ces régions variables sont le fait de nombreuses erreurs de la RT et sont très immunogènes ce qui complique le développement d'un vaccin efficace contre l'infection VIH-1. Parmi ces régions, la boucle V3 est la plus importante, elle contient l'épitope majeur de neutralisation et est dévoilée après interaction de la gp120 avec le CD4 (Moore and Nara 1991; Zolla-Pazner, Cohen et al. 2007).

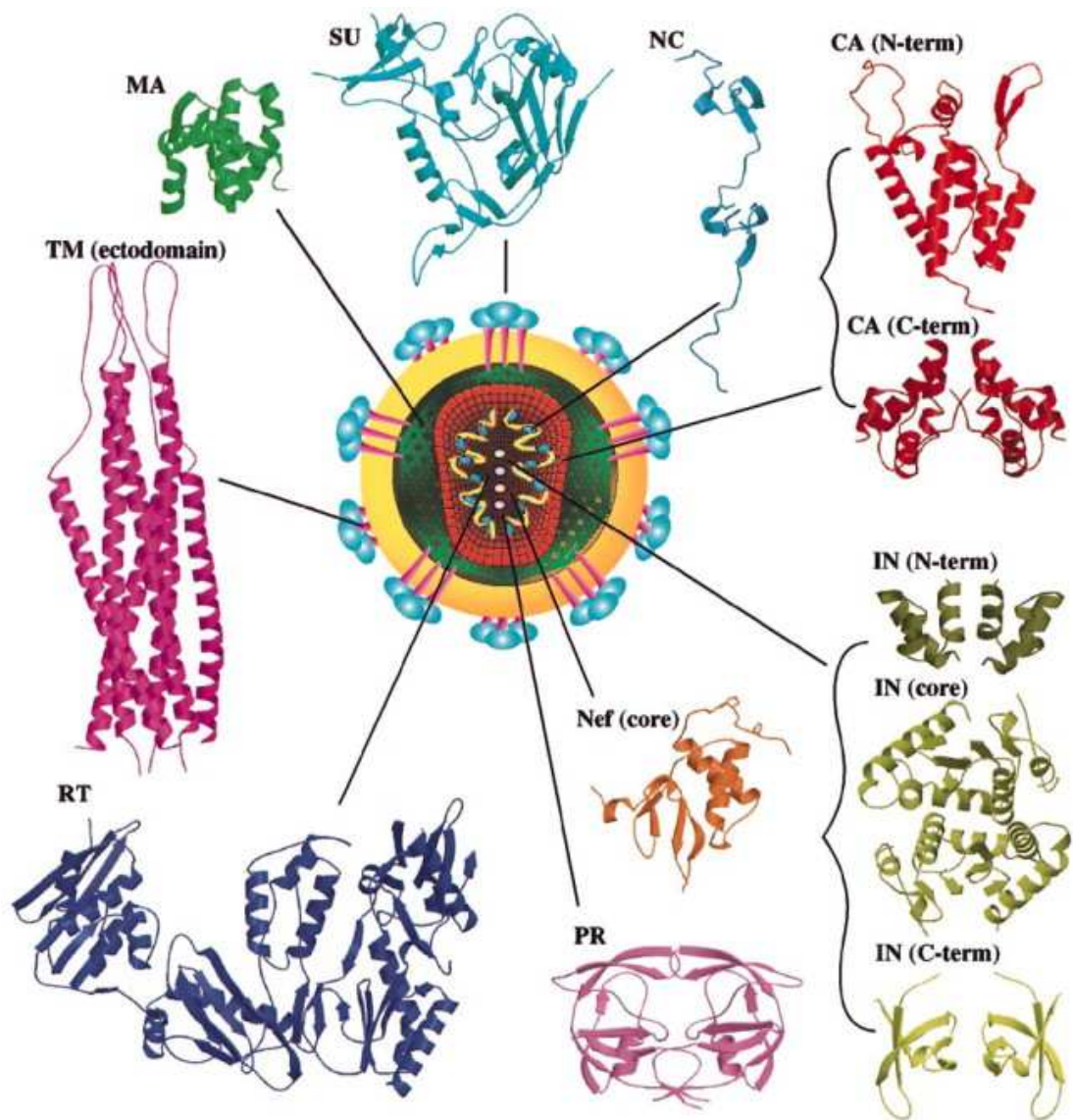
Notons que les virus CCR5 et CXCR4 tropiques se distinguent par la structure et la charge de leur boucle V3 (Verrier, Borman et al. 1999).

Les virus VIH-1 ont été classés en trois groupes distincts. Le groupe O et le groupe N qui sont minoritaires sont localisés dans des régions précises du globe, essentiellement dans certains pays de l'Afrique de l'Ouest (Ayouba, Mauclere et al. 2001; Arien, Abraha et al. 2005) et le groupe M qui est majoritaire et disséminé dans toutes les régions du globe. Ce groupe est lui-même sous divisé en 10 sous-groupes ou sous-types.

- gp41 : Elle joue un rôle essentiel dans la fusion des membranes du virus et des cellules cibles. Elle contient deux domaines hydrophobes, l'un permettant l'ancrage à la membrane et l'autre contenant le peptide de fusion en N-terminal.

Les gp120 et gp41 forment des spicules oligomériques à la surface des particules virales. Chaque spicule est constituée d'un trimère de gp120 et d'un trimère de gp41. Ces protéines sont liées entre elles par des liaisons non covalentes.

Figure 5 : Représentation schématique d'une particule de VIH-1 : En bleu le trimère de la gp120 (SU) en association avec un trimère de la gp41 (TM) en rose. La protéine de la matrice (MA), en vert, est associée à la membrane virale grâce à son extrémité N terminale myristylée. Les autres protéines (CA pour capside, PR pour protéase , RT pour reverse transcriptase, IN pour intégrase) associées au virus sont représentées, avec les différentes couleurs. D'après (Turner and Summers 1999)



2 - Protéines de régulation

Contrairement aux autres rétrovirus, le VIH-1 présente, en plus des produits des gènes *gag*, *pol*, *env* toute une série de protéines accessoires (Tat, Rev, Nef, Vpu, Vpr, Vif) dont certaines sont essentielles comme Tat et Rev.

a - Tat :

La protéine Tat est indispensable à la réplication virale. C'est un transactivateur de la transcription. Elle agit au niveau de la région TAR du LTR des ARNm naissants. En l'absence de Tat, la transcription se termine prématurément par une interruption de l'élongation. La protéine Tat, en se fixant sur la région TAR du LTR du nouveau brin en cours de transcription va recruter la cycline T1 et la kinase Cdk9 formant un complexe Tat-cycline T-Cdk9. Ce complexe permet l'activation de l'élongation suite à l'action de la Cdk9 qui va phosphoryler le domaine C-terminal de RNA polymérase II (Herrmann and Rice 1995; Wei, Garber et al. 1998).

La protéine Tat est constituée de quatre régions distinctes, de N-terminal en C-terminal, on trouve une région riche en cystéines, un cœur très conservé entre les différents isolats de virus, une région basique et une région riche en glutamines. Le segment basique contient le domaine d'interaction avec la région TAR. Ce domaine basique est également essentiel pour l'activité d'internalisation de la protéine Tat.

En plus de son rôle essentiel dans le cycle viral, la protéine Tat, libérée dans le sérum des patients infectés, est capable d'interagir avec les cellules non infectées et interférer avec l'équilibre des réseaux de cytokines en le déplaçant vers un état favorable à la réplication du virus.

De nombreuses études ont montré que la protéine Tat induit la production d'IL-10, une cytokine fortement immunosuppressive (Badou, Bennasser et al. 2000; Bennasser, Contreras et al. 2001; Bennasser and Bahraoui 2002). Cela suggère donc que la protéine Tat pourrait jouer un rôle dans l'évolution de la maladie vers le stade SIDA en participant à l'affaiblissement du système immunitaire. En effet il a été montré une corrélation entre le taux d'IL-10 dans le sérum des patients infectés et l'évolution de la maladie vers le stade SIDA (Vasilescu, Heath et al. 2003). En accord avec cette hypothèse, il a été observé qu'une réponse humorale ou cellulaire anti-Tat est associée avec le contrôle de l'évolution de la

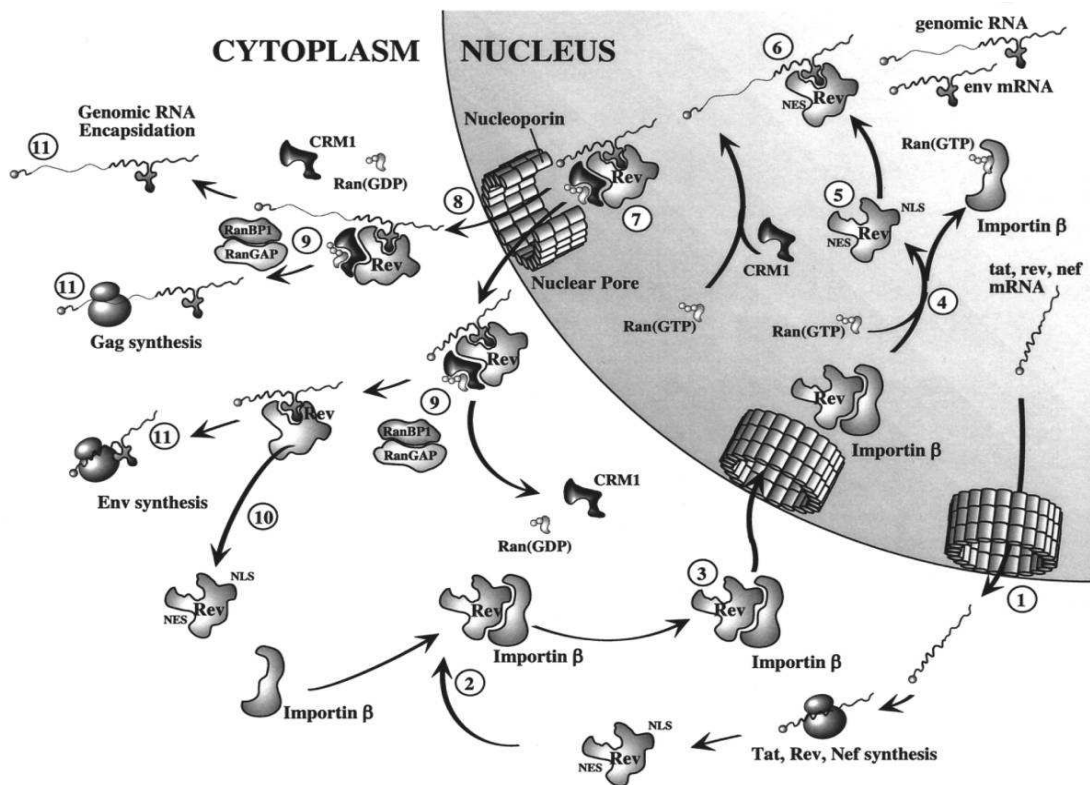
maladie (Re, Vignoli et al. 2001) d'où un intérêt pour l'inclusion de la protéine Tat comme immunogène dans le développement de toute composition de candidat vaccin anti-VIH.

La protéine Tat possède également un fort pouvoir pathogène, en effet elle peut induire l'apoptose cellulaire (Bartz and Emerman 1999), activer les cellules quiescentes les rendant sensibles à l'infection par le VIH (Huang, Bosch et al. 1998), stimuler l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , augmenter l'expression des co-récepteurs du VIH (Xiao, Neuveut et al. 2000), induire la production d'IL-10 (Badou, Bennasser et al. 2000), inhiber l'expression de l'IL-12 et de l'enzyme mitochondriale, la manganèse superoxyde dismutase, enzyme dont l'activité est essentielle par la lutte contre les radicaux libres oxygénés.

b - Rev

La protéine Rev est une protéine impliquée dans l'export nucléaire des ARN « mono » ou non épissés (Figure 6). En effet, le VIH-1 utilise 9 cadres de lecture ouverts à partir d'un seul transcrit. Certaines molécules d'ARN, comme les ARN génomiques (pas d'épissage) ou les ARN ayant subi un seul épissage comme celui codant pour la protéine Env, doivent être exportées du noyau. Hors, les ARNm ne peuvent pas sortir du noyau si ils contiennent des introns. C'est pour cela que le VIH utilise la protéine Rev qui permet de mobiliser le mécanisme des importines cellulaires pour l'export des ARN viraux mono ou non épissés. Tout comme Tat et Nef, la protéine Rev est traduite durant la phase précoce. Elle est traduite à partir d'un petit ARNm mature multi épissé capable d'être exporté vers le cytoplasme. Une fois traduite dans le cytoplasme, la protéine Rev interagit avec l'importine β via son domaine NLS (Nuclear localisation signal) et franchit les pores nucléaires. Une fois dans le noyau, la protéine Rev se dissocie de l'importine et se lie à l'ARN au niveau de la séquence RRE (Rev Responsive Element) puis à la protéine CRM1 par le domaine NES. La séquence RRE est composée de 234 nucléotides et se localise au niveau du gène *env* (Malim, Hauber et al. 1989). Le complexe Rev-CRM1-ARN est exporté à travers les pores nucléaires vers le cytoplasme de la cellule où les ARNm seront traduits ou encapsidés pour donner de nouvelles particules virales.

Figure 6 : Rôle de la protéine Rev dans l'export des ARNm mono ou non épissés. Les différentes étapes sont décrites dans le texte. D'après (Fields, Knipe et al. 2007).



c - Nef

La protéine Nef (negative factor) est une protéine de 27 kDa myristylée en N-terminal. Elle est exprimée à de fortes concentrations dès les premiers stades de l'infection virale. Elle est essentielle pour maintenir une forte charge virale. Des études sur le SIV ont montré qu'un mutant délété de Nef ne conduit plus, ou uniquement après une grande période au développement du SIDA chez le macaque (Kestler, Ringler et al. 1991; Daniel, Kirchhoff et al. 1992). La protéine Nef possède également deux activités de régulation négative :

Elle diminue l'expression des récepteurs CD4 à la surface des cellules infectées (Goldsmith, Warmerdam et al. 1995). La protéine Nef, en interagissant directement avec la queue cytoplasmique de CD4 induit son endocytose et son transport vers le lysosome où il sera dégradé (Salghetti, Mariani et al. 1995). La diminution des récepteurs CD4 est importante pour prévenir la séquestration des virus produits après bourgeonnement. Ce mécanisme permet de faciliter la dissémination du virus pour aller infecter de nouvelles cellules. Elle diminue l'expression des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules. Des études ont montré que Nef conduisait à l'endocytose des molécules du CMHI et à leur dégradation dans le lysosome (Schwartz, Marechal et al. 1996) mais des travaux plus

récents ont montré qu'elle agit aussi sur l'adressage des molécules de classe I et provoque ainsi son accumulation dans le Golgi (Le Gall, Buseyne et al. 2000). La modulation par Nef des molécules du CMHI nécessite une tyrosine qui est présente sur le domaine cytoplasmique des chaînes lourdes HLA-A et HLA-B et va conduire à l'accumulation des ces molécules dans des vésicules de clathrine. Comme conséquence, les cellules infectées par le virus seront protégées contre la lyse par les Lymphocytes T CD8 cytotoxiques spécifiques des antigènes du VIH.

d - Vpu

Vpu est une protéine membranaire composée de 81 acides aminés qui n'est pas incorporée dans les particules virales. Elle est constituée de 3 hélices α , une hélice en N-terminal, comprenant les résidus 1 à 27 qui est ancrée dans la membrane et deux hélices amphipathiques, comprenant les résidus 28-81, qui forment une queue cytoplasmique (Federau, Schubert et al. 1996; Willbold, Hoffmann et al. 1997). Contrairement aux autres protéines de régulation, la protéine Vpu est trouvée uniquement chez le VIH-1. Chez le SIV, elle est remplacée par la protéine Vpx.

Vpu possède deux rôles importants qui sont d'une part la dégradation des CD4 et d'autre part l'augmentation de la production de particules virales.

Vpu interagit avec les CD4 présents dans les complexes CD4-gp160 et les dirige vers le réticulum endoplasmique où ils seront dégradés. Cela permet en outre d'augmenter la quantité de gp160 pouvant être incorporée dans les virions (Willey, Maldarelli et al. 1992; Willey, Maldarelli et al. 1992). Après phosphorylation, Vpu se fixe au CD4 et à la bTrCP (beta transducine Containing Protein) grâce aux domaines WD et va ainsi recruter le protéasome ce qui va conduire à la dégradation du CD4 (Margottin, Bour et al. 1998).

Vpu a aussi un rôle sur l'efficacité de relargage des particules virales. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer ce rôle :

- Vpu a la capacité de former des canaux ioniques (Ewart, Sutherland et al. 1996). La présence de ces canaux pourrait modifier le potentiel électrique de la membrane cytoplasmique facilitant ainsi la formation et le relargage des virions (Strebel 2007).
- Vpu a la capacité de contrecarrer une restriction cellulaire à la formation de particules virales (Varthakavi, Smith et al. 2003). D'autres travaux ont montré

que Vpu interagit avec les canaux potassiques Task-1 et inhibe leur activité (Hsu, Seharaseyon et al. 2004).

- Vpu contribue à augmenter la charge virale dans le plasma ce qui permettrait d'augmenter le nombre d'infections *de novo* conduisant à l'échappement aux anticorps neutralisants et ainsi à une progression vers le stade SIDA (Li, Halloran et al. 1995; Mackay, Niu et al. 2002).

f - Vpr

Vpr (Viral protein R) est une protéine tardive de 96 acides aminés qui est incorporée dans les particules virales dans des quantités avoisinantes celle des produits du gène *gag*. La protéine Vpr joue plusieurs rôles. Tout d'abord, elle favorise la pénétration dans le noyau des cellules non différenciées, comme les monocytes, du complexe de pré-intégration viral. En effet, ce complexe pénètre facilement dans le noyau des cellules différenciées comme les macrophages mais moins bien dans les monocytes. Cela est possible par la fixation de Vpr sur l'importine α (Nitahara-Kasahara, Kamata et al. 2007). Vpr bloque aussi le cycle cellulaire en phase G2, ce qui favorise la réplication virale. Vpr bloquerait un facteur cellulaire indispensable à la transition G2-M en s'y fixant par sa partie carboxy terminale, le conduisant à son ubiquitylation et à sa dégradation (DeHart, Zimmerman et al. 2007). Ce blocage du cycle cellulaire peut aussi être corrélé à l'interaction de Vpr avec la protéine p21, qui, en plus d'activer le LTR est capable aussi d'interagir avec Sp1, TFIID et CBP (Cui, Tungaturthi et al. 2006).

g - Vif

c'est une protéine de 23 kDa produite tardivement sous la dépendance de Rev. C'est une protéine essentielle pour l'infectiosité des particules virales, une délétion du gène *vif* semble avoir un effet sur l'infectiosité (Kishi, Nishino et al. 1992).

Vif est indispensable au moment de la formation de la particule virale pour réguler l'assemblage et la maturation des virions.

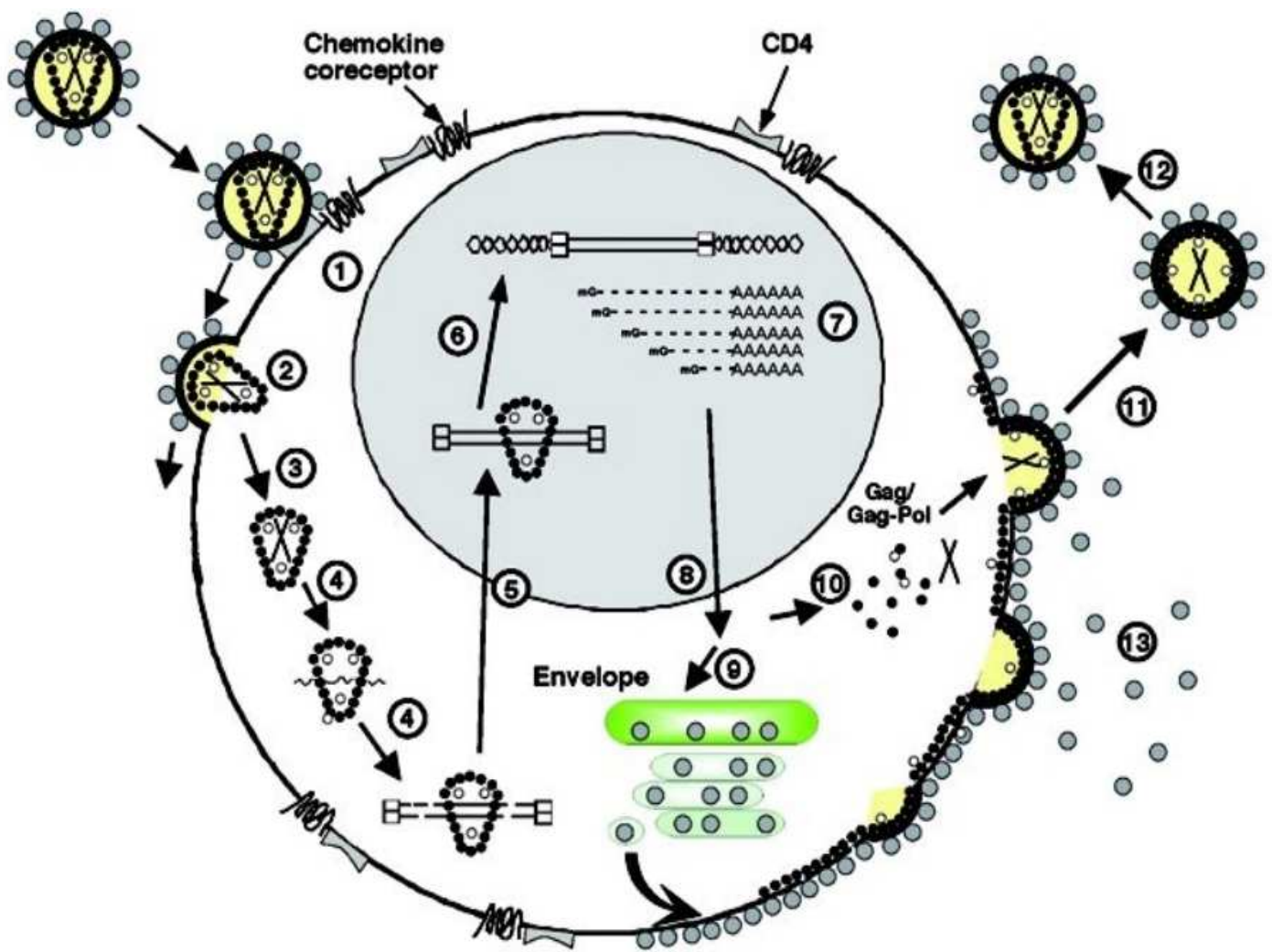
La protéine APOBEC3G est une cytidine deaminase exprimée quasiment chez toutes les cellules cibles du VIH-1. Cette protéine possède une forte activité antivirale. Il a été montré que les virus VIH déficients pour Vif incorporaient cette protéine, les rendant non infectieux, alors que les virus exprimant Vif ne l'incorporent pas (Mariani, Chen et al. 2003).

Il est admis que Vif interagit directement avec APOBEC3G ce qui conduit à son ubiquitinylation et à sa dégradation par le protéasome et donc à son absence des particules virales (Strebel 2007).

Vif possède aussi d'autres fonctions : cette protéine peut se fixer aux ARN et fait partie du complexe de transcription inverse, elle possède également une activité anti-protéase qui éviterait une maturation trop précoce de la gp160 (Potash, Bentsman et al. 1998).

B - Cycle de réplication du VIH-1

Figure 7 : schéma représentant le cycle de réplication du virus VIH-1. Modifié d'après (Fields, Knipe et al. 2007).



1 : adsorption
2 : fusion
3 : transcription inverse
4 : décapsidation
5 : import nucléaire

6 : intégration
7 : synthèse des ARNm
8 : export nucléaire des ARN
9 : transport et glycosylation de Env
10 : transport des produits gag-pol

11 : encapsidation et relargage de virions immatures
12 : maturation des protéines virales
13 : relargage Env immatures

1 - Fixation du virus sur les cellules cibles

La première étape du cycle de réplication du VIH correspond à la reconnaissance par la glycoprotéine gp120 du récepteur CD4 présent à la surface des cellules cibles (Bour, Schubert et al. 1996). Cette interaction se fait avec une forte affinité, la constante de dissociation est de l'ordre de 10^{-9} M (Lasky, Nakamura et al. 1987).

La molécule CD4 est une glycoprotéine transmembranaire de 55 kDa qui appartient à la superfamille des immunoglobulines. Elle est constituée d'un domaine cytoplasmique fortement chargé composé de 38 acides aminés, d'un domaine transmembranaire hydrophobe de 25 acides aminés et de quatre domaines extracellulaires distincts D1 à D4 organisés en feuillets β . Le domaine D1 est subdivisé en trois régions, CDR1 (complementary determining region) comprenant les acides aminés 19 à 24, CDR2 les acides aminés 40 à 53 et CDR3 les acides aminés 87 à 89. La molécule CD4 est principalement exprimée à la surface des lymphocytes T auxiliaires et stabilise l'interaction entre les récepteurs des lymphocytes T et les molécules du CMH de classe II présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. CD4 est exprimé également à la surface des macrophages et des cellules dendritiques.

Le CD4, bien qu'il soit nécessaire, n'est pas suffisant pour médier l'entrée du virus par fusion. De nombreux travaux ont permis d'identifier les principaux co-récepteurs de VIH-1. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs à 7 segments transmembranaires (protéines constituées de sept hélices transmembranaires) couplés aux protéines G. Deux principaux co-récepteurs sont impliqués dans l'entrée du VIH-1. Ils permettent de classer les virus suivant leur utilisation différentielle. Le co-récepteur CXCR4 est utilisé par les virus à tropisme lymphocytaire et le co-récepteur CCR5 par les virus à tropisme macrophagique. Ces récepteurs ont pour ligands naturels les chimiokines RANTES, MIP1 α , MIP1 β pour CCR5 et le SDF 1 α pour CXCR4 (Berger, Murphy et al. 1999).

2- Mode d'entrée du virus

Le mécanisme de fusion du VIH est indépendant du pH. La fixation de la gp120 sur le CD4 entraîne un changement de conformation de cette dernière lui permettant d'interagir avec les co-récepteurs CCR5 ou CXCR4. Cette deuxième interaction provoque une modification de la structure de la gp41 rendant accessible son domaine de fusion N-terminal qui s'ancre alors dans la membrane de la cellule cible. Le rapprochement des membranes virale et cellulaire a

lieu grâce à l'interaction entre les domaines HRI (heptad repeat I) et HRII (heptad repeat II) localisés sur le domaine externe de la gp41. Ce rapprochement des deux membranes est suivi par la formation d'un pore de fusion permettant au génome viral de pénétrer dans le cytoplasme de la cellule cible. Ce mécanisme est détaillé précisément dans le chapitre suivant.

3- Transcription inverse

Après la fusion, la nucléocapside est relarguée dans le cytoplasme où commence l'étape de transcription inverse. La transcription inverse se déroule à l'intérieur de la capsid virale après que cette dernière soit entrée dans le cytoplasme. La transcription inverse est une caractéristique des rétrovirus et représente une étape clef dans le cycle viral (Figure 8).

Une réorganisation des protéines de la matrice ainsi qu'un relargage des protéines de la capsid sont observés (Stevenson 1996; Bukrinsky 2004).

Au cours de cette transcription inverse, l'ARN simple brin viral est rétro-transcrit en ADN simple brin dans un premier temps puis en ADN double brin grâce à la transcriptase inverse virale qui possède à la fois une activité transcriptase inverse et une activité nucléase H.

Le mécanisme de transcription inverse peut être résumé ainsi :

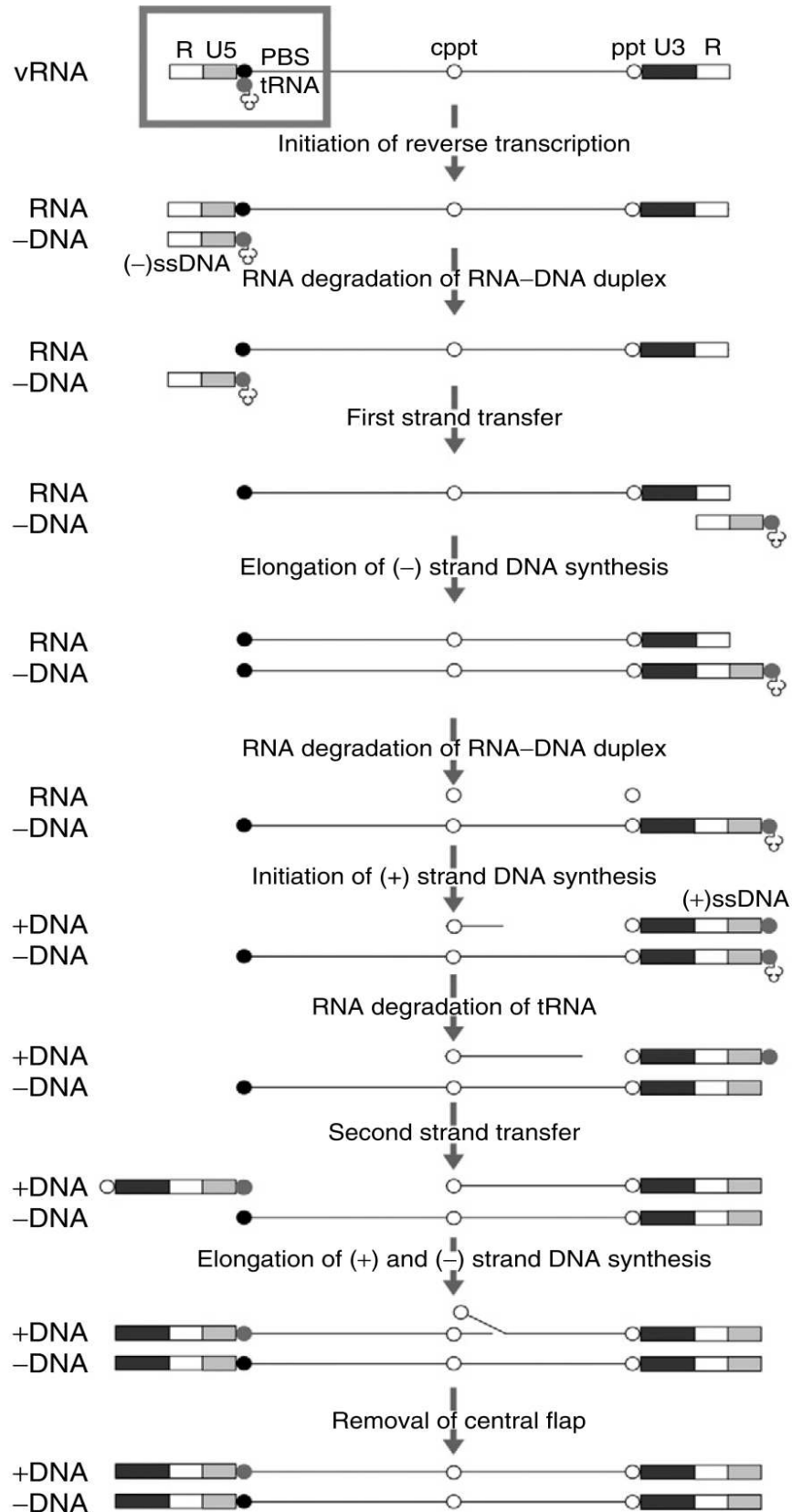
Une première étape d'initiation consiste en la fixation d'un ARNt^{lys} au voisinage de l'extrémité 5' de l'ARN viral où il s'apparie via les 18 nucléotides de sa partie 3'OH avec la région PBS de l'ARN viral. Le complexe de transcription inverse synthétise alors le brin complémentaire de l'ARN viral comme décrit dans la figure 8. Après cette synthèse, le brin d'ARN de l'hybride ARN-ADN est dégradé par l'activité RNase H de la RT sauf au niveau des régions riches en polypurines (PPT).

La synthèse du deuxième brin d'ADN, de polarité positive, est initiée grâce aux amorces riches en purines, appelées polypurine tracts (PPT) se trouvant au niveau de la région U3 du LTR 3' ainsi qu'au centre du génome (cPPT). Au cours de cette synthèse, on observe un chevauchement de deux segments de taille identique. Ce chevauchement, appelé « triplex central » est le résultat d'un déplacement des 99 premiers nucléotides du brin d'ADN +. Ce phénomène est également appelé DNA-Flap. Il constitue la fin de la transcription inverse et est nécessaire pour permettre le transport du complexe de pré-intégration dans le noyau (Zennou, Petit et al. 2000; Hameau, Jeusset et al. 2001; Ao, Yao et al. 2004).

De nombreuses mutations dans le génome viral ont lieu au cours de cette étape car la transcriptase inverse n'a pas d'activité correctrice. Environ $3 \cdot 10^{-5}$ erreurs par génome ont lieu à chaque réplication (Mansky and Temin 1995). Ces mutations se produisant dès les premiers stades du cycle de réplication, elles sont propagées à tous les virions produits par ce cycle ce qui induit la plupart du temps l'apparition de quasi espèces chez un même individu infecté. Ces mutations, dans le cas où elles ne sont pas létales pour le virus, lui permettent d'échapper aux tentatives de neutralisation par les produits de la réponse immune anticorps neutralisante et CTL CD8 spécifiques ainsi qu'aux différentes drogues.

L'étape de décapsidation suit la transcription inverse (Arhel, Souquere-Besse et al. 2007). Cette étape est encore mal comprise, mais elle semble passer par des modification de la protéine de la capsid qui subit des phosphorylations par des MAP kinases (Cartier, Sivarid et al. 1999). La cyclophiline A, une protéine chaperonne, participe dans la déstabilisation des protéines de la capsid (Franke and Luban 1995). La protéine Vif joue un rôle en augmentant la stabilité du core viral (Goncalves, Korin et al. 1996) et, en s'associant avec la pompe à protons V-ATPase, elle contribue à la décapsidation en provoquant des changements locaux de pH (Schaeffer, Geleziunas et al. 2001). La formation du « DNA Flap » à la fin de l'étape de transcription inverse semble également jouer un rôle majeur dans la décapsidation (Arhel, Souquere-Besse et al. 2007).

Figure 8 : Représentation schématique de la transcription inverse. Il est à noter que la suppression du « DNA Flap » n'a pas lieu au cours de l'étape de transcription proprement dite mais après intégration.



4- Intégration

L'intégration est également une particularité des rétrovirus. Elle suit directement l'étape de transcription inverse et, après le passage du pore nucléaire, consiste en l'insertion du génome viral dans le génome cellulaire, on parle alors de provirus. Cette intégration est suivie de l'expression du génome viral dans certaines cellules activées alors que le virus peut rester à l'état latent dans d'autres cellules. L'intégration est catalysée par l'intégrase. Dans le cas du VIH, l'ADN néosynthétisé est lié au complexe de pré-intégration (CPI). Ce complexe de pré-intégration est constitué de protéines virales (intégrase, protéines MA, protéines NC, Vpr) et cellulaires (dont les importines). Le CPI est transporté via les filaments d'actine au voisinage de la membrane nucléaire afin de traverser les pores nucléaires. L'ADN viral sera alors intégré dans le génome cellulaire, après coupure de ce dernier. Une fois l'ADN viral intégré, la machinerie cellulaire réparera les coupures ayant permis son insertion dans l'ADN cellulaire. L'intégration semble se faire dans des sites non spécifiques mais dans des régions qui sont actives pour la transcription. Plusieurs copies peuvent s'intégrer dans le génome de l'hôte en fonction du type cellulaire. Une fois intégré, le provirus se comportera comme n'importe quel gène cellulaire. Il pourra rester sous forme latente ou s'exprimer dans les cellules activées pour donner de nouvelles particules virales qui, à leur tour, pourront infecter de nouvelles cellules.

5- Expression du génome viral et production des particules virales

La régulation de l'expression du génome viral est sous la dépendance du promoteur LTR. De nombreux facteurs de régulation de la transcription peuvent induire l'expression du génome viral en fonction du type cellulaire et du stade d'activation des cellules infectées. Lors de la phase précoce de transcription, l'un des principaux facteurs de régulation dans les lymphocytes T activés est le facteur de transcription NF- κ B qui est normalement impliqué dans la régulation de nombreux gènes de cytokines lors des processus d'inflammation (Alcami, Lain de Lera et al. 1995). D'autres facteurs de transcription, comme NFAT et AP-1 (activator protéine-1), sont également impliqués dans l'activation de la transcription du génome viral. NFAT est un facteur de transcription cytoplasmique qui est transloqué, après sa déphosphorylation par la calcineurine, dans le noyau lorsque la concentration de calcium augmente dans la cellule. NFAT reconnaît des motifs sur la même région du LTR que celle

reconnue par NF- κ B. C'est un activateur de la transcription qui agit sur des séquences κ B-like présentes sur de nombreux promoteurs de gènes viraux et cellulaires (Cron, Bartz et al. 2000; Manley, O'Hara B et al. 2006; Manley, O'Hara et al. 2008). Lors de la phase tardive de la transcription, d'autres facteurs de régulation essentiels, viraux cette fois, interviennent. La protéine Tat qui, en se fixant sur l'élément TAR du LTR, au niveau de l'ARNm naissant, augmente considérablement le taux de transcription des ARN viraux en améliorant l'efficacité du complexe RNA pol II. En effet, en se fixant à la région TAR, la protéine Tat recrute la cycline T1 et la kinase CDK9 qui, en hyperphosphorylant le domaine C-terminal de la PolIII, active sa fonction d'élongation.

Après activation du promoteur la synthèse d'ARN peut commencer. Les différents ARNm vont être traduits en précurseurs protéiques qui vont être ensuite maturés soit par la protéase virale pour Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol} soit par des protéases cellulaires telles que la furine ou PC7 pour la gp160 qui donnera ensuite la glycoprotéine de surface gp120 et la glycoprotéine transmembranaire gp41.

Le précurseur Pr55^{Gag} sera clivé pour donner différents constituants du virus que sont MA, NC, CA, p6 et p7.

Les précurseurs protéiques Pr55^{Gag}, Pr160^{Gag-Pol}, Env ainsi que des protéines de régulation comme Vpu sont impliquées dans l'assemblage des particules virales et leur bourgeonnement (cf. chapitre 1).

Les protéines Gag sont suffisantes pour former des particules virales non infectieuses. Après sa synthèse le précurseur Pr55^{Gag} est rapidement transporté vers la membrane plasmique au niveau des radeaux lipidiques où se déroulera l'assemblage. Les radeaux lipidiques facilitent la fixation de pr55 à la membrane ainsi que les interactions entre protéines Gag. La fixation à la membrane de Gag est aussi facilitée par son domaine MA myristylé. La protéine CA issue du clivage de Gag par la protéase virale va permettre la formation de la particule virale. En effet le clivage MA-CA entraîne un changement de conformation de la partie N-terminale de CA qui joue un rôle important dans les modifications morphologiques aboutissant à la formation de la particule. Enfin, la protéine NC (p7) a pour principale fonction d'encapsider l'ARN viral grâce à une séquence d'encapsidation de 120 nucléotides compris entre le LTR 5' et le codon d'initiation de Gag. La protéine p6 est essentielle pour le bourgeonnement des particules virales. En effet grâce à son domaine P(S/T)AP qui interagit avec le domaine ESCRT-I de la protéine Tsg101 ubiquitinyllée, elle recrute cette dernière au niveau des sites d'encapsidation, permettant le bourgeonnement de la particule virale grâce au

complexe ESCRT (Stuchell, Garrus et al. 2004). En interagissant avec Vpr ou Vpx pour VIH-2, p6 va également permettre leur incorporation dans la particule virale.

Au cours de sa synthèse, la protéine Env est glycosylée et oligomérisée à l'intérieur du réticulum endoplasmique. Elle est ensuite transportée via l'appareil de Golgi jusqu'aux radeaux lipidiques de la membrane plasmique. Le mécanisme d'incorporation de Env dans les virions n'est pas parfaitement connu.

En complément des protéines virales, le virion incorpore également de nombreuses protéines de l'hôte dont les antigènes d'histocompatibilité HLA I et II, des molécules d'adhésion comme le CD44, CD55, CD59 et ICAM-1. Ces molécules augmentent considérablement l'infectivité des virions. En effet les molécules HLA vont augmenter les capacités du virion à interagir avec CD4. ICAM-1 va également augmenter l'infectiosité des virions pour les cellules cibles exprimant l'intégrine LFA-1 qui est le ligand naturel de ICAM-1 (Fortin, Cantin et al. 1997). Les molécules CD55 et 59 peuvent agir en protégeant les virions de la dégradation par le complément.

Il est à noter que la formation des particules virales diffère suivant le type cellulaire. Contrairement à ce qui vient d'être décrit pour le lymphocyte notamment, dans les macrophages, le processus d'encapsidation semble être différent. En effet, il se déroule principalement au niveau des endosomes avant que les virions soient transportés jusqu'à la membrane plasmique.

Une fois les virions immatures relargués, la protéase virale peut cliver les différents précurseurs de Gag et Gag-Pol afin de produire les protéines p17, p24, p7 et p6 ainsi que les enzymes virales qui permettront de produire les particules virales matures qui seront infectieuses.

C- Pathogenèse du VIH

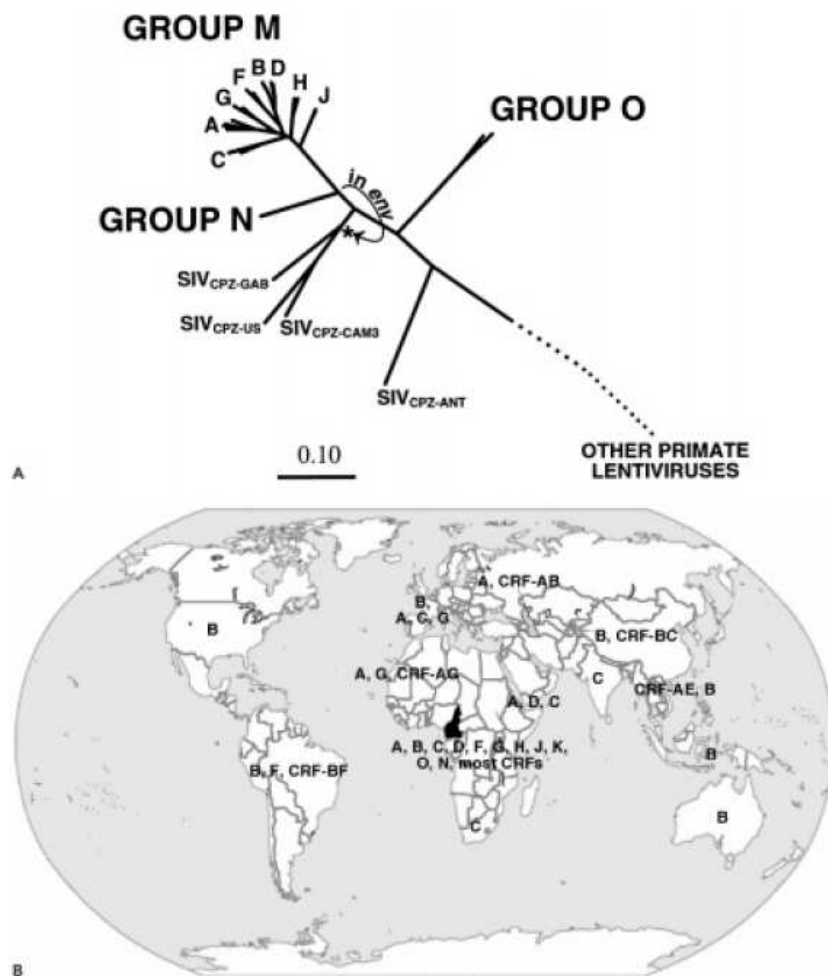
1- Variabilité du VIH

Deux principaux types de VIH ont été découverts, il s'agit du VIH de type 1 et de type 2. Le type 1 est largement majoritaire et disséminé sur l'ensemble du globe alors que le type 2, minoritaire, est localisé principalement en Afrique de l'Ouest et plus modérément en Europe de l'ouest. La période d'incubation du VIH-2 est plus longue que celle du VIH-1. Il est aujourd'hui admis que le VIH-2 est beaucoup moins pathogène que le VIH-1 (Kanki, Travers et al. 1994; Gilbert, McKeague et al. 2003). L'organisation des deux types de VIH est

globalement identique excepté la présence du gène *vpx* pour le VIH-2 à la place du gène *vpu* chez VIH-1. On observe également des variations au niveau de certains gènes, notamment *env* qui présente seulement 42% d'homologie entre les deux types. Les autres gènes sont globalement identiques.

Les variations au sein des gènes *gag*, *pol*, *env* ont permis de classer le VIH en trois groupes, le groupe M (majoritaire), lui même subdivisé en 10 sous-groupes (notés A-J), le groupe O (outlier) présent en Afrique de l'Ouest et le groupe N (ni M ni O) présent au Cameroun. Ces trois groupes ne présentent pas ou peu d'antigénicité croisée entre eux, ce qui peut poser un problème au niveau du diagnostic si ces groupes de virus arrivent à se disséminer à travers le monde.

Figure 9 : A : arbre phylogénétique représentant les différents groupes de virus et B : répartition géographique des différents groupes et sous-groupes de virus.
(Fields, Knipe et al. 2007).



2- Transmission du VIH :

Le principal mode de transmission du VIH a lieu actuellement principalement, par contact sexuel. Bien que la transmission homosexuelle fut la première observée et reste majoritaire en Europe et en Amérique du Nord, la transmission hétérosexuelle reste majoritaire dans le monde, particulièrement en Afrique et en Asie. La transmission sexuelle n'est pas le seul mode de propagation du VIH, les contacts avec des produits sanguins, notamment par transfusion ou par échanges de seringues contaminées permettent également la transmission du virus. Cependant, certaines associations d'aide aux toxicomanes fournissent des seringues neuves afin de diminuer ce mode de contamination. Le virus peut également se transmettre, de façon verticale, de la mère à l'enfant lors de l'accouchement ou lors de l'allaitement. Toutefois, ce risque peut être largement diminué si la mère reçoit un traitement antiviral avant l'accouchement.

La fragilité des muqueuses vaginales mais surtout rectales expliquent la facilité de cette transmission. Le virus peut facilement traverser les épithélia de ces muqueuses et aller infecter les cellules immunitaires sous-jacentes. De plus les micro lésions, plus nombreuses au niveau de la muqueuse rectale favorisent l'infection en permettant au virus d'entrer directement en contact avec les cellules cibles (lymphocytes, macrophages et cellules dendritiques).

La charge virale est différente suivant les sécrétions, elle est en effet beaucoup plus élevée dans le sperme que dans les sécrétions vaginales ce qui peut expliquer le risque de contamination homme-femme plus important (voir tableau 2).

Risques de transmission	
Facteur de transmission	Taux de transmission
Sexuel	
Femme-->Homme	1/700 - 1/3000
Homme-->Femme	1/200 - 1/2000
Homme-->Homme	1/10 - 1/1600
Transmission mère-->enfant	
Avec AZT	1/4
Sans AZT	<1/10
Autres facteurs	
Transfusion avec sang contaminé	95/100
Echange de seringues	1/150
Piqûre de seringues	1/2000
Piqûre de seringues + AZT	1/100000

Tableau 2 : taux de transmission du VIH suivant le mode de contamination.

D'après (Royce, Sena et al. 1997)

On distingue 3 stades dans l'évolution de la maladie après infection avec le VIH-1:

a - Primo infection

C'est le premier stade suivant directement la contamination par le virus. Lors de ce stade, la plupart des individus nouvellement infectés présentent des symptômes d'une mononucléose ou d'une grippe qui apparaissent environ 3 à 6 semaines après l'infection et qui s'étalent sur 15 jours environ avant de s'atténuer. Environ 3 semaines après l'infection on observe une chute des lymphocytes T CD4 liée à une forte augmentation de la réplication virale, ces deux phénomènes étant observables dans le sang. Durant cette phase, la charge virale présente dans le sang, les sécrétions vaginales, le sperme et le lait maternel sont très importantes ce qui augmente les risques de contamination. Le nombre de virions est compris entre 10^7 et 10^8 par ml de plasma et les protéines virales sont facilement détectables. C'est également au bout de 3 à 6 semaines qu'une réponse immunitaire antivirale peut être détectée. Une réponse immune cytotoxique CD8 spécifique (CTL pour Cytotoxic T lymphocyte) est détectée dans un premier temps avec une efficacité modérée mais qui parvient cependant à contrôler le pic d'antigénémie observée lors de la primo infection. Cette réponse cellulaire est suivie d'une réponse humorale qui représente une signature de l'infection par le VIH-1 et qui est utilisée pour la mise en évidence d'une séropositivité anti-VIH dans des tests de diagnostic. Malheureusement, malgré l'activation de ces deux types de réponse, le système immunitaire ne parvient pas à éliminer l'infection virale.

b - Latence

La période de latence peut s'étendre de 3 à plus de 10 ans durant laquelle l'individu infecté ne présente pas ou peu de symptômes. Le virus est toujours détectable durant cette période mais sa réplication est relativement contrôlée par le système immunitaire. Il s'agit en fait d'un système d'équilibre entre la réplication virale et l'activité du système immunitaire. Cependant, la charge virale reste beaucoup plus importante dans les ganglions lymphatiques et le tissu gastro intestinal lymphatique (GALT). Toutefois, après plusieurs années d'équilibre, le taux de lymphocytes T CD4+ dans le sang périphérique commence à décroître jusqu'à atteindre 1% de perte par jour (environ 30 à 60 cellules/mm³/année). Toutefois chez certains individus (1 à 2% de la population infectée) cette période de latence

est beaucoup plus longue, pouvant atteindre une vingtaine d'années. Ce phénomène est encore à l'étude mais il semblerait lié à la présence de défensines particulières (alpha 1, 2 et 3) douées de propriétés antivirales chez ces personnes (Zhang, Yu et al. 2002). Lorsque le taux de lymphocytes T CD4 passe en dessous de $200/\text{mm}^3$ certains symptômes (fatigue, amaigrissement, diarrhées, apparition d'infections opportunistes, d'herpès ou de zona) peuvent apparaître.

c - Stade SIDA

Lorsque le taux de LT CD4 devient anormalement bas ($<200/\text{mm}^3$) le système immunitaire n'est plus en mesure de faire face aux agressions extérieures ou aux agents normalement inoffensifs pour un sujet sain. Ce stade est appelé SIDA pour syndrome d'immunodéficience acquise. De nombreux agents engendrant différentes maladies opportunistes vont profiter de la faiblesse du système immunitaire. Les plus courantes sont des pneumonies à *Pneumocystis carinii*, la tuberculose, des mycoses, les infections par cytomégalovirus, la toxoplasmose, des lymphomes, des encéphalites et méningites ainsi que le sarcome de Kaposi et des tumeurs comme les lymphomes B. Le système immunitaire est également gravement affaibli par la destruction des organes lymphoïdes (Bonyhadi, Rabin et al. 1993).

3- Facteurs impliqués dans la progression de la maladie

De nombreux facteurs sont impliqués dans la progression plus ou moins rapide de la maladie selon les personnes. La charge virale, la quantité d'ARN viral présent dans le plasma durant la primo infection semble avoir un impact important sur la progression de la maladie. Plus elle est élevée, plus la phase asymptomatique sera courte et par conséquent la déclaration du stade SIDA plus rapide. L'âge des individus infectés est également un facteur déterminant, les personnes plus âgées possédant un système immunitaire moins performant sont donc plus susceptibles au développement rapide de la maladie (Darby, Ewart et al. 1996). Les co-récepteurs sont également impliqués et particulièrement le CCR5. En effet une partie de la population (environ 10 % de la population blanche) possède une mutation sur le gène *CCR5* (hétérozygote pour la mutation delta 32) et 1 % sont homozygotes pour cette mutation (Liu, Paxton et al. 1996). Les personnes homozygotes présentent une résistance à l'infection par les VIH R5-tropic et ceux qui sont hétérozygotes ont un développement de la maladie beaucoup

plus lent que le reste de la population. Notons que les personnes homozygotes pour la mutation delta 33 semblent plus sensibles à l'infection par le virus West Nile.

La prise de traitement a également un impact important sur l'évolution vers le stade SIDA. Les personnes sous tri-thérapie peuvent voir leur période asymptomatique prolongée de plusieurs années. Actuellement, une personne placée sous tri-thérapie dès la primo infection ne développe la maladie qu'après 10-15 ans post infection. Cependant, certains individus ne supportent pas forcément le traitement qui est particulièrement lourd pour l'organisme principalement par son mode d'administration qui nécessite deux injections sous-cutanées par jour. Il entraîne également l'apparition d'effets secondaires gênants. De plus, certaines souches de virus présentant des résistances aux différents anti-rétroviraux peuvent rester insensibles à ces traitements ou émerger après une certaine période de traitement.

4- Cellules cibles du VIH

Le virus VIH-1 infecte essentiellement les cellules exprimant le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 ou CXCR4, principalement les lymphocytes T4, les macrophages, monocytes et les cellules dendritiques (Dalglish, Beverley et al. 1984; Klatzmann, Champagne et al. 1984; Moore 1997).

In vitro cependant seules les cellules présentant le récepteur CD4 à leur surface peuvent être infectées par le VIH. Comme nous l'avons vu précédemment un co-récepteur CCR5 ou CXCR4 est également requis. On peut également observer dans certains cas l'infection de cellules CD4-, le virus utilisant dans ces conditions le co-récepteur CCR5 ou CXCR4 seul (Endres, Clapham et al. 1996; Reeves, Hibbitts et al. 1999).

En fonction du type cellulaire infecté on observe quelques variations sur l'infection des cellules cibles. En effet, l'infection des lymphocytes T nécessite une activation préalable des cellules. Cette activation ayant entre autre, comme effet, l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui reconnaît des sites de fixation au niveau du promoteur LTR du VIH-1. La fixation de ce facteur sur ces promoteurs stimulera l'expression des protéines virales issues de ces gènes. L'infection des lymphocytes T préalablement activés conduit à la mort de la cellule alors que celle des macrophages dont l'activation préalable n'est pas nécessaire ne leur est pas fatale.

5- Traitements/résistance

Depuis que le VIH a été découvert au début des années 80, les scientifiques n'ont eu de cesse de chercher des moyens de lutte contre le virus. Comme il a été décrit dans les paragraphes précédents, de nombreuses enzymes virales sont utilisées au cours du cycle de réplication du VIH-1. Ces enzymes sont indispensables au cycle viral et constituent donc des cibles de choix pour la mise au point de molécules inhibitrices.

Deux approches ont été particulièrement développées : une approche pharmacologique (mettant en jeu des petites molécules antagonistes des différentes molécules impliquées dans le cycle viral ainsi que de petites molécules analogues aux substrats des enzymes virales) et une approche immunologique utilisant des anticorps ou des lymphocytes cytotoxiques CD8 dirigés spécifiquement contre les différentes protéines virales ou cellulaires.

a - Approches pharmacologiques

L'une des premières molécules antivirales utilisée pour contrer le VIH fut initialement conçue dans le but d'obtenir une molécule avec une activité anticancéreuse. Cette molécule, l'AZT ou azidothymidine, n'eut pas les effets escomptés. Mais en 1974 des chercheurs ont démontré qu'elle avait un effet inhibiteur sur le rétrovirus de la leucémie murine de Friend. En 1985, ses propriétés anti-VIH furent démontrées.

Depuis cette découverte, des inhibiteurs agissant à chacune des étapes du cycle viral ont été recherchés et certains développés jusqu'à l'obtention de leur autorisation de mise sur le marché pour leur utilisation chez l'homme. Ces inhibiteurs médicaments permettent aujourd'hui la mise en place de multi-thérapie. La tri-thérapie, qui est la combinaison de 3 molécules différentes notamment des anti-transcriptase inverse et anti-protéase, en est le meilleur exemple.

Les différentes molécules inhibitrices sont présentées ici suivant l'étape du cycle viral où elles interviennent :

a-1 - Interaction virus-cellule cible

Cette étape, faisant l'objet de cette thèse, sera exposée en détail ultérieurement.

Plusieurs molécules seront présentées. Il s'agit notamment de CD4 soluble, d'analogues des glycoprotéines gp120 et gp41, d'analogues des chimiokines, de petites molécules chimiques ciblant les sites d'interaction des différents partenaires et d'anticorps dirigés contre les protéines virales ou les récepteurs cellulaires.

a-2 - Transcription inverse

L'étape de transcription inverse est une étape clé dans le processus de réplication virale, c'est pour cela que c'est une cible privilégiée dans la recherche de molécules inhibitrices. Elle a lieu grâce à l'action de la transcriptase inverse virale qui utilise les nucléotides cellulaires comme substrat.

Deux types d'inhibiteurs ont été mis au point, classés suivant leur mode d'action : il s'agit d'inhibiteurs analogues de nucléoside et d'analogues non nucléosidiques.

Les analogues nucléosidiques

Ces inhibiteurs, qui nécessitent une phosphorylation préalable dans la cellule, agissent comme substrat compétiteur et peuvent également arrêter la polymérisation.

L'inhibiteur nucléosidique le plus connu et utilisé est l'azidothymidine ou AZT (3'-azido-3'-deoxythymidine) (Yarchoan, Klecker et al. 1986). C'est un didéoxynucléoside analogue de la thymidine. Après une triple phosphorylation, il agit spécifiquement sur la transcriptase inverse en entrant en compétition avec les déoxynucléosides cellulaires, bloquant ainsi l'élongation de l'ADN (du fait de l'absence du groupe hydroxyle en 3' nécessaire pour la liaison phosphodiester 3'-5' avec la base suivante). L'analogue AZT-3P présente une activité 100 fois plus importante que l'AZT (Larder, Darby et al. 1989). Utilisé en clinique, l'AZT retarde la progression vers le stade SIDA, augmente la survie des personnes qui ont déjà atteint le stade SIDA et diminue considérablement le risque de contamination de mère à enfant. Il est commercialisé sous le nom de Retrovir® et entre dans la composition d'autres médicaments comme le Combivir® ou le Trizivir®.

Un autre analogue de la thymidine, la Stavudine (d4T) est également utilisée en clinique (Zurit™) avec une meilleure efficacité que la Zidovudine.

De nombreux autres analogues sont également en cours de développement voire en phase clinique. On trouve notamment des analogues de cytosine comme l'Emtricitabine ou la

Lamivudine (Epivir™, Kivexa™) des analogues de guanosine tels que l'Amdoxovir ou des analogues phosphorylés comme le Ténofovir.

Les analogues non nucléosidiques

D'autres inhibiteurs non nucléosidiques sont également développés. Ils sont de natures variées et ne requièrent pas d'activation métabolique, notamment la phosphorylation requise pour les analogues nucléosidiques. Leur mode d'action est différent de ces derniers. En effet, ils inhibent la transcriptase inverse en interagissant directement avec elle. Ces inhibiteurs regroupent une trentaine de classe de molécules chimiques (De Corte 2005).

Les premiers de ces inhibiteurs ont été découverts en 1987. Il s'agit du TIBO ou R82913 (,5,6,7-tetrahydro-5-methylimidazo[4,5,1-*jk*](1,4)benzodiazepin-2(1*H*)-one) et ses dérivés qui ont ouvert la voie à toute une série d'inhibiteurs.

Trois molécules sont actuellement sur le marché. Il s'agit de l'Efavirenz (Sustiva®), de la Néviparine (Viramune®) et de la Delarvidine (Rescriptor®) avec des effets secondaires plus ou moins néfastes pour l'organisme. L'Efavirenz, notamment, provoque des effets indésirables sur le système nerveux central (Usami, Ashino et al. 2007).

a-3 - Intégration

Cette étape est également très importante pour le virus car elle permet l'insertion de l'ADN viral dans le génome cellulaire. Contrairement aux autres inhibiteurs comme les antagonistes ou les analogues de substrats, les inhibiteurs de l'intégrase agissent indirectement en chélatant le magnésium qui est indispensable à l'activité de l'enzyme.

Peu de molécules sont actuellement développées, cependant certaines sont disponibles pour les patients qui sont déjà en échec avec les autres traitements :

On trouve notamment la molécule MK-0518 ou Raltegravir (Grinsztejn, Nguyen et al. 2007) développé par Merck. Une autre molécule vient d'entrer en phase III d'étude clinique, l'Elvitégravir ou GS-9137 (Berger 2008).

D'autres molécules ont été également mises au point mais ne sont pas utilisées en thérapie actuellement. On trouve par exemple les dicéto-acides (L708 906, L731, 988) qui ont un effet antiviral (Hazuda, Felock et al. 2000) en bloquant le transfert de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire.

Le L-870, 810 dans lequel le groupement dicéto-acide est remplacé par un groupement [1,6]-naphtyridine est par contre entré en phase clinique.

Une autre classe d'inhibiteurs, les styrylquinoléines qui agissent comme compétiteurs au niveau du site catalytique de l'intégrase sont également étudiés (Firley, Courcot et al. 2006).

L'utilisation de ces molécules pose cependant un problème. En effet, contrairement aux autres inhibiteurs ciblant les différentes étapes du cycle, les inhibiteurs de l'intégrase n'entraînent pas la disparition des ADN viraux qui vont persister dans la cellule sous forme circulaire. Cette persistance soulève une question quant au devenir de ces ADN sur le long terme.

a-4 - Maturation

De nombreux travaux ont étudié la protéase virale du VIH. Cette activité est essentielle pour la réplication du VIH. C'est elle qui permet la maturation des différentes protéines impliquées dans le cycle du virus. Ces inhibiteurs agissent pour la plupart par compétition en présentant une séquence analogue au substrat naturel mais comprenant un acide aminé non hydrolysable (Hostetler, Richman et al. 1994).

Le premier inhibiteur de protéase à avoir été introduit en clinique est le Ro 31-8959 ou saquinivir qui agit sur la protéase virale en inhibant le clivage de Gag-Pol en mimant la liaison peptidique phenylalanine-proline. Cependant, il est rapidement dégradé.

Un des inhibiteurs le plus connu est le Ritonavir (Norvir®, Kaletra®). Il inhibe l'isozyme 3A du cytochrome P450 responsable du métabolisme de la plupart des inhibiteurs de protéase. C'est pour cela qu'il est souvent co-administré avec d'autres inhibiteurs comme l'indinavir par exemple.

L'indinavir (Crixivan®), quant à lui, possède la propriété de pénétrer le système nerveux central ce qui est particulièrement intéressant pour lutter contre les affections touchant le SNC comme la démence associée au VIH. On peut citer également le Nefinavir (Viracept®) et l'amprénavir (Agenerase®) mais ces derniers sont peu utilisés en clinique.

En plus de la toxicité intrinsèque plus ou moins importante de ces inhibiteurs (Rayner, Esch et al. 2001) et du fait que le traitement finit souvent par induire l'émergence de virus résistants (Zhang, Imamichi et al. 1997; Mahalingam, Louis et al. 1999), il est important de souligner que ces inhibiteurs n'ont pas la même capacité de diffusion dans tous les tissus. Par conséquent, dans certains tissus, les concentrations efficaces ne sont pas réellement atteintes.

Cette limitation contribue certainement à la sélection des virus résistants et à la protection des virus contre l'effet antiviral de ces inhibiteurs. Ces tissus peuvent représenter de vrais réservoirs pour la maintenance et l'échappement du virus.

a-5 - Protéines de régulation

Les protéines de régulation Nef, Rev, Tat, Vif, et Vpr font également l'objet d'études afin de développer des inhibiteurs capables de bloquer leurs activités biologiques qui sont essentielles pour la réplication ou l'infectiosité du virus.

L'apparition de virus résistants en présence d'inhibiteurs spécifiques est liée principalement au peu de fidélité de la transcriptase inverse. En effet, les erreurs de réplication conduisent à l'apparition de mutants où le site d'action des inhibiteurs est modifié, les mutants viables présentant ces modifications devenant par conséquent insensibles à ces inhibiteurs.

Un des moyens permettant de s'affranchir de cette contrainte est l'utilisation d'une combinaison de ces différentes molécules, ciblant chaque étape du cycle viral. Cela permet une meilleure efficacité dans la lutte contre la progression de la maladie. C'est pour cela que la tri-thérapie a été mise en place à partir de 1996. Cependant l'apparition d'isolats résistants persiste. L'ajout de la molécule T20 à la tri-thérapie permettait de limiter ce problème mais des résistants au T20 sont également apparus (Poveda, Rodes et al. 2005; Reeves, Lee et al. 2005; Perez-Alvarez, Carmona et al. 2006). De plus ces thérapies sont très lourdes pour le patient et inefficaces pour certains.

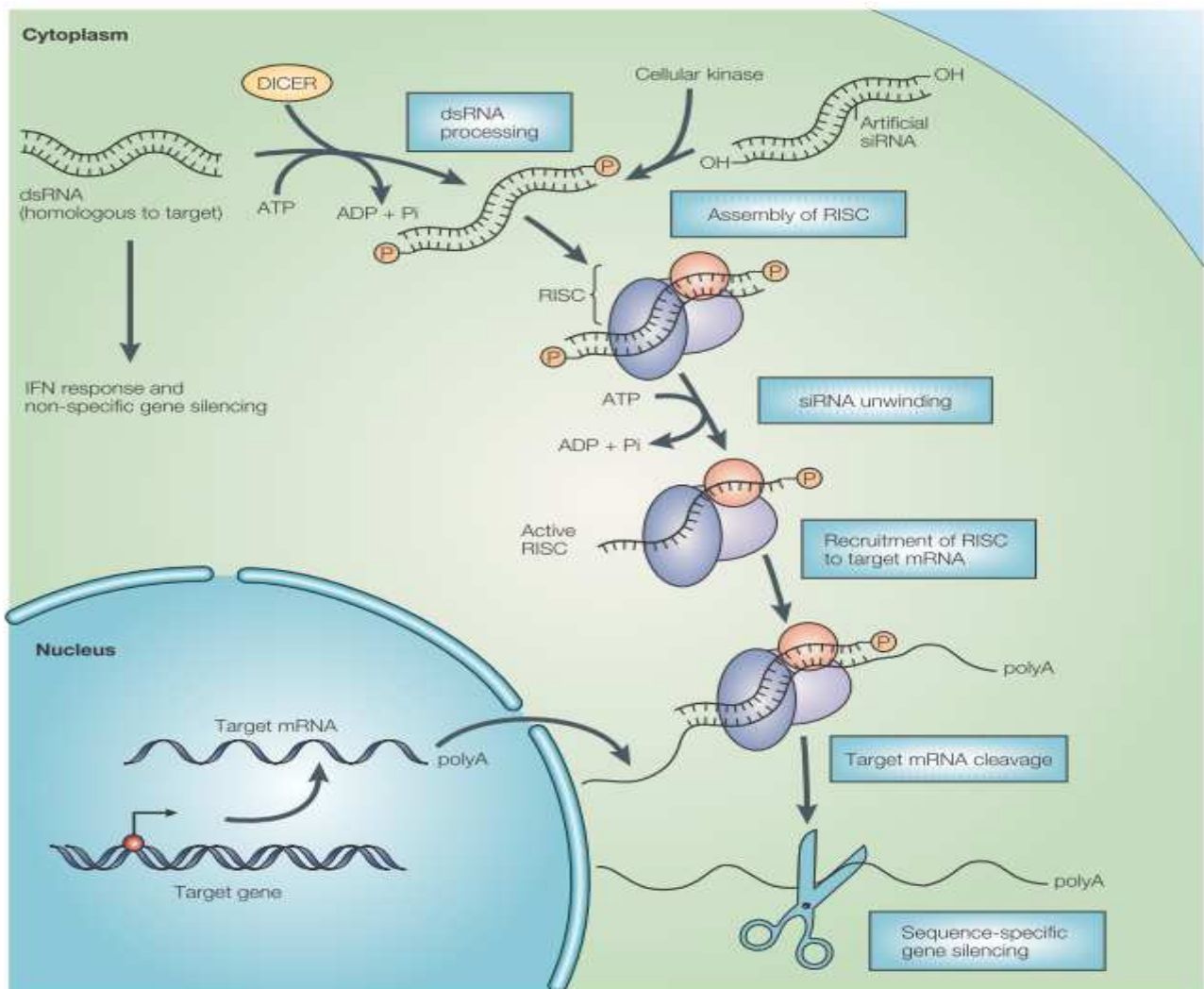
b - Approche utilisant les ARN interférants

L'interférence à ARN constitue aujourd'hui un puissant outil pour analyser les fonctions des gènes. Elle permet en effet d'inhiber sélectivement l'expression d'un gène cible en dégradant de façon séquence spécifique le transcrit correspondant, sans affecter l'expression d'autres gènes. L'interférence à ARN, détaillée dans la légende de la figure 10, est largement employée en virologie pour étudier la fonction des gènes nécessaires à l'accomplissement du cycle viral. Cette technique peut également être utilisée pour étudier les interactions virus-cellule, en inhibant des ARN codant pour des protéines cellulaires potentiellement impliquées dans le déroulement du cycle viral (exemples du virus de l'immunodéficience humaine VIH, du virus de l'hépatite C VHC et des Adénovirus).

L'interférence à ARN représente donc un outil précieux pour la recherche de nouvelles cibles antivirales.

Deux classes des petites molécules d'ARN ont été décrites comme étant des régulateurs post-transcriptionnel séquence spécifique: les RNA interférants (ou siRNA) et les micro ARN (ou miRNA). Les ARN interférants, de 21 à 23 oligonucléotides non codants, sont produits à partir d'un double brin d'ARN qui est synthétisé *in vitro* ou *in vivo* à partir des virus ou des séquences répétitives introduites par ingénierie génétique. Les siRNA artificiels peuvent être introduits par des techniques de transfection ou à l'aide de vecteurs comme les vecteurs lentiviraux.

Figure 10 : A : Mécanisme d'action des ARN interférants. Les ARN double brin synthétisés par la cellule sont reconnus par DICER puis clivés et phosphorylés en petits ARN double brin de 20nt. Ces petits ARN ou des ARN doubles brins artificiels (introduits par transfection par exemple) s'associent ensuite avec le complexe multiprotéique RISC qui les déshydrate. L'ARNm cible est ensuite reconnu par ce complexe RISC-ARN simple brin puis dégradé en présence d'ATP. (Stevenson 2003)



Les applications des ARN interférants comme médicament font l'objet de nombreux travaux dans des domaines variés incluant les antiviraux, les cancers (Aharinejad, Sioud et al. 2007; Hadj-Slimane, Lepelletier et al. 2007; Huang, Li et al. 2008), des maladies neurodégénératives (Koutsilieri, Rethwilm et al. 2007; Orlacchio, Bernardi et al. 2007) ou l'angiogénèse oculaire pathologique (Campochiaro 2006).

Des résultats très encourageants ont été obtenus avec cette approche dans l'infection VIH-1 en ciblant soit directement des gènes viraux tel que *tat*, *rev*, *nef*, *gag*, *pol* (Jacque, Triques et al. 2002; Lee, Coburn et al. 2003; Dave and Pomerantz 2004; Han, Wind-Rotolo et al. 2004; Lee and Rossi 2004; Lee, Dykxhoorn et al. 2005) ou des gènes cellulaires tel que CD4 ou CCR5 (Novina, Murray et al. 2002; Lee, Coburn et al. 2003; Qin, An et al. 2003; Song, Lee et al. 2003).

Malheureusement cette promesse thérapeutique s'est vue atténuée récemment par les travaux montrant que le virus peut échapper à l'effet antiviral des siRNA par l'intermédiaire de la protéine Tat qui est capable de bloquer ce mécanisme en inhibant DICER (Bennasser, Le et al. 2005; Bennasser, Yeung et al. 2006).

c - Approche immunologique

La mise au point d'un vaccin efficace est un enjeu majeur dans la lutte contre le VIH. Depuis sa découverte, de nombreuses équipes ont essayé de stimuler le système immunitaire afin d'induire le développement d'une réponse mémoire neutralisante efficace sur le long terme. Plusieurs approches ont été testées en utilisant par exemple le virus inactivé. Cette approche est toutefois risquée car il n'est jamais certain que le virus soit totalement inactivé et ce, quelle que soit la méthode utilisée. Une autre approche consiste à utiliser des protéines virales comme la gp120, Tat ou Nef (Moynier, Kavsan et al. 1998; Cazeaux, Bennasser et al. 2002) comme antigènes pour stimuler le système immunitaire. Les approches utilisant des virus recombinants, du vaccin ADN ou des vaccins peptidiques à base de peptides correspondants à des épitopes de neutralisation ont été également testées. Malheureusement aucune de ces approches vaccinales n'a été en mesure de produire un vaccin efficace contre le VIH *in vivo*. Notons cependant que certaines approches concernant le SIV ont permis d'induire une réponse immune cellulaire cytotoxique, type CTL CD8, qui s'est révélée capable de contrôler la charge virale mais sans pour autant protéger les animaux vaccinés contre l'établissement de la primo-infection par le virus de l'épreuve (SIV ou SHIV en

fonction des protocoles). C'est le cas par exemple du modèle SIV/macaques immunisés avec le MVA (modified vaccinia virus Ankara) en primo-injection et de l'ADN plasmidique contenant différents gènes de VIH-1 (*env*) et des gènes de SIV (*gag* et *pol*). Cependant, des résultats plus récents ont montré que cette protection n'est pas conservée dans le temps, comme le démontre l'apparition de virus résistants (Amara, Villinger et al. 2001).

Récemment la firme Merck a mis fin à un essai vaccinal en phase clinique car il n'avait aucun effet (http://www.merck.com/newsroom/press_releases/research_and_development/2007_0921.html 2007).

Toutefois, même si la mise au point d'un vaccin prophylactique s'avère très difficile à réaliser, l'ensemble de la communauté scientifique s'oriente plutôt actuellement vers le développement d'un vaccin thérapeutique administrable aux personnes déjà infectées. Le but recherché avec un tel vaccin est de stimuler le système immunitaire permettant ainsi de réduire la charge virale et contribuer à restaurer les fonctions normales du système immunitaire avec une augmentation du nombre des lymphocytes T CD4. Ce type de traitement pourrait permettre, d'une part, de stopper l'évolution de la maladie et, d'autre part, de diminuer la probabilité de contamination entre humains par contact sexuel, la charge virale dans le sperme ou les sécrétions vaginales ayant fortement diminué.

Certains anticorps peuvent effectivement avoir des propriétés antivirales. C'est le cas notamment des anticorps monoclonaux b12, 2G12, et 2F5. Ces anticorps reconnaissent, respectivement, le site de la gp120 impliqué dans l'interaction avec CD4, un épitope glycanique de la gp120 et un domaine de la gp41 impliqué dans la fusion et qui n'est accessible qu'au moment de la phase transitoire au cours du mécanisme de fusion. Cependant l'application avec les anticorps semble plus adaptée pour le développement de microbicides.

Pages suivantes : *Tableau 3 : représentation des essais cliniques en cours de divers candidats vaccins anti-VIH. Les antigènes utilisés pour ces essais sont tous issus de protéines virales.*

Ongoing Trials of Preventive AIDS Vaccines

Trial No.	Title	Start Date	Organizer, Developer	Countries (No. of sites)	Vaccine Name	Antigen (Clade)
PHASE III Large trials in high-risk populations to test vaccine efficacy						
RV 144	A trial of Sanofi Pasteur live recombinant ALVAC-HIV (vCP1521) priming with VaxGen gp120 B/E (AIDSVAX B/E) boosting	Oct-03	DoD, Thailand MOPH, NIAID TAVEG, Sanofi, VaxGen	Thailand (8)	Prime: ALVAC vCP1521 Boost: AIDSVAX B/E	<i>env</i> (B,E); <i>gag/pol</i> , <i>env</i> (B,E)
PHASE II Mid-sized trials in low- and high-risk populations to test vaccine safety and immunogenicity						
HVTN 204	A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of a multiclade HIV-1 DNA plasmid vaccine, VRC-HIVDNA-016-00-VP, followed by a multiclade recombinant adenoviral vector HIV-1 vaccine boost, VRC-ADV-014-00-VP	Sep-05	NIAID, Vical, GenVec	US (7), Brazil (2), South Africa (3) Later: Haiti, Jamaica	Prime: VRC-HIVDNA-016-00-VP Boost: VRC-ADV-014-00-VP	<i>gag, pol, nef</i> (B), <i>env</i> (A,B,C); <i>gag, pol</i> (B), <i>env</i> (A,B,C)
PHASE I/II Small trials moving into mid-sized trials in low- and high-risk populations to test vaccine safety and immunogenicity						
ANRSVAC20/EV03	A trial to compare the immunogenicity and safety of 3 DNA C prime followed by 1 NYVAC C boost to 2 DNA C prime followed by 2 NYVAC C boost	Aug-07	ANRS, EuroVacc	France (5), UK, Switzerland, Germany	DNA-C, NYVAC-C	<i>env, gag, pol, nef</i> (C); <i>env, gag, pol, nef</i> (C)
NCHECR-AE1	A randomized, placebo-controlled, double-blind, clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of a candidate prophylactic, pHIS-HIV-AE prime followed by rFPV-HIV-AE boost (a non-replicating, recombinant fowlpox virus vector delivering same genes as prime)	Feb-07	The National Centre in HIV Epidemiology and Clinical Research, The University of South Wales	Thailand	Prime: pHIS-HIV-AE Boost: rFPV-HIV-AE	<i>gag, pol, tat/rev, env</i> (A,E)
HIVIS 03	A clinical trial to assess the safety and immunogenicity of a plasmid DNA-MVA prime-boost HIV-1 vaccine candidate	Dec-06	MUCHS, Karolinska Institute, SMI, Vecura, USMHRP	Tanzania	Prime: HIVIS DNA Boost: MVA-CMDR	<i>env</i> (A,B,C), <i>gag</i> (A,B), RT (B), <i>rev</i> (B); <i>env</i> (E), <i>gag</i> (A), <i>pol</i> (E)
PHASE I Small trials in low-risk populations to test vaccine safety and immunogenicity						
Ad26.ENVA.01	A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 vaccine (Ad26.ENVA.01)	Feb-08	NIAID	US	Ad26.ENVA.01	<i>env</i> (A)
IAVI C004/DHO-614	A study to evaluate the local and systemic reactogenicity following serial administration of ADVAX, ADVAX e/g + ADVAX p/n-t, by Ichor TriGrid™ <i>in vivo</i> electroporation	Oct-07	Rockefeller University, ADARC, Bill & Melinda Gates Foundation, Ichor Medical Systems, IAVI	US	ADVAX (ADVAX e/g and ADVAX p/n-t)	<i>env, gag, pol, nef, tat</i> (C)
HVTN 072	A Phase Ib clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of recombinant adenoviral serotype 35 (rAd35) and serotype 5 (rAd5) vaccine when given in heterologous prime-boost regimens or as a boost to a recombinant DNA vaccine in adults with pre-existing immunity to adenovirus serotype 5 infection	Aug-07	NIAID	US	VRC-HIVADV027-00VP VRC-HIVADV038-00VP VRC-HIVDNA044-00-VP	<i>env</i> (A); <i>env</i> (A); <i>env</i> (A)
SGO6RS02	A clinical trial in female volunteers to evaluate the reactogenicity and immunogenicity of nine vaginal immunizations with HIV ZM96gp140 glycoprotein	Jul-07	SGUL	UK	ZM96gp140	gp140; <i>env</i> (C)
VRC 012 (07-1-0167)	A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of an HIV-1 adenoviral vector serotype 35 vaccine using dose escalation as a single agent and prime-boost schedules with an HIV-1 adenoviral vector serotype 5 vaccine	Jun-07	NIAID, VRC	US	VRC-HIVADV027-00-VP VRC-HIVADV038-00-VP	<i>env</i> (A); <i>env</i> (A)
DVP-1	A clinical trial to evaluate the tolerability and safety of a multi-envelope, prime-boost HIV vaccine (DVP)	May-07	St. Jude	US	EnvDNA, PolyEnv1, EnvPro	
HVTN 067	A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of DNA vaccine EP-1233 and recombinant MVA-HIV polytope vaccine MVA-mBN32, separately and in a combined prime-boost regimen, when given to vaccinia-naïve adults	Apr-07	NIAID, Pharmexa-Epimmune	US (3)	DNA vaccine EP-1233 and recombinant MVA-HIV polytope vaccine MVA-mBN32	<i>env, gag, pol, vpu</i> (B); <i>gag, pol, vpr, nef</i> (A,B,C,D,E,G)
HVTN 069	A Phase Ib trial to compare safety, tolerability, and immunogenicity of an adenoviral vector boost administered intramuscularly, intradermally, or subcutaneously after a DNA plasmid vaccine prime administered intramuscularly to adenovirus type 5 seropositive adults	Nov-06	NIAID	US (6)	Prime: VRC-HIVDNA-009-00-VP Boost: VRC-ADV-014-00-VP	<i>gag, pol, nef</i> (B), <i>env</i> (A,B,C); <i>gag, pol</i> (B), <i>env</i> (A,B,C)
HPTN 027	A study to evaluate the safety and immunogenicity of ALVAC-HIV vCP1521 in infants born to HIV-1 infected women	Oct-06	NIAID, Sanofi	Uganda	ALVAC-HIV vCP1521	<i>env</i> (B,E)
VRC 011 (06-1-0149)	A clinical trial of intramuscular, subcutaneous, and intradermal administration of an HIV-1 multiclade DNA vaccine, VRC-HIVDNA-016-00-VP, and an HIV-1 multiclade adenoviral vector vaccine, VRC-ADV-014-00-VP	May-06	NIAID	US	Prime: VRC-HIVDNA-016-00-VP Boost: VRC-ADV-014-00-VP	<i>gag, pol, nef</i> (B), <i>env</i> (A,B,C); <i>gag, pol</i> (B), <i>env</i> (A,B,C)
HVTN 065	A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of pGA2/JS7#2 DNA vaccine and recombinant MVA-HIV 62 vaccine	Apr-06	NIAID, Geovax	US (5)	Prime: HIVB DNA pGA2/JS7#2 Boost: MVA-HIV 62	<i>gag, pro, RT, env, tat, rev, vpu</i> (B); <i>gag, pol, env</i> (B)

Ongoing Trials of Preventive AIDS Vaccines

Trial No.	Title	Start Date	Organizer, Manufacturer	Countries (No. of sites)	Vaccine Name	Antigen (Clade)
PHASE I Small trials in low-risk populations to test vaccine safety and immunogenicity (continued)						
HVRF-380-131004	A clinical trial to evaluate safety and tolerability of administering VICHREPOL, carrying chimeric recombinant protein comprised of C-terminal p17, full p24, and immunoreactive fragment of gp41 with polyoxidoonium adjuvant	Mar-06	Moscow Institute of Immunology, Russian Federation Ministry of Education and Science	Russian Federation	VICHREPOL with polyoxidoonium adjuvant	<i>env, gag</i> (B)
RV 138/WR 811	A study of Sanofi Pasteur live recombinant ALVAC-HIV (vCP205, HIV-1 <i>env/gag/pol</i>) administered subcutaneously via <i>ex vivo</i> transfected, autologous dendritic cells, intradermally or intramuscularly	Mar-06	USMHRP	US	ALVAC-HIV vCP205	<i>env, gag, pol</i> (B)
HIVIS 02	A clinical trial to assess the safety and immunogenicity of administering MVA, carrying HIV-1 genes <i>env, gag, and pol</i> in volunteers who previously received plasmid DNA with analogous HIV-1 genes in HIVIS 01	Jan-06	Karolinska Institute, SMI, USMHRP	Sweden	MVA-CMDR	<i>env</i> (E), <i>gag</i> (A), <i>pol</i> (E)
RV 158/WR 1143	A double-blind, randomized, dose escalating, placebo-controlled, study of safety and immunogenicity of WRAIR/NIH live recombinant MVA-CMDR (HIV-CM235 <i>env</i> /CM240 <i>gag/pol</i>) administered intramuscularly or intradermally	Jul-05	USMHRP, WRAIR	US Later: Thailand	MVA-CMDR	gp160, <i>gag, pol</i> (A,E)
EnvDNA	A clinical trial to evaluate the safety and tolerability of a recombinant HIV-1 multi-envelope DNA plasmid vaccine (EnvDNA)	May-05	St. Jude, NIAID	US	EnvDNA	<i>env</i> (A,B,C,D,E)
N/A	A randomized, placebo-controlled, double-blind trial to evaluate the safety and immunogenicity of a multiclade HIV-1 DNA plasmid vaccine	Mar-05	Guangxi CDC	China	DNA Vaccine	DNA plasmids (B,C)
HVTN 050/Merck 018	A dose-escalating study of the safety, tolerability, and immunogenicity of a 3-dose regimen of the MRKAd5 HIV-1 gag vaccine	Jun-03	NIAID, Merck	Thailand, Brazil Haiti, Puerto Rico	MRKAd5 HIV-1 gag	<i>gag</i> (B)

Source : <http://www.iavireport.org/trialsdb/>

NIAID: US National Institute of Allergy and Infectious Diseases. The **Vaccine Research Center (VRC)** is a NIAID intramural program that develops and manufactures vaccine candidates, conducts Phase I clinical trials, and performs comprehensive immunological analyses. The **Division of AIDS (DAIDS)** is a NIAID extramural organization that provides regulatory sponsorship and funding for extramural clinical trials. The **HIV Vaccine Trials Network (HVTN)** is a clinical trial organization funded by a cooperative agreement from DAIDS that conducts Phase I through Phase III studies and a full spectrum of immunological and statistical analyses. For more information on specific trials go to www.clinicaltrials.gov.

ADARC: Aaron Diamond AIDS Research Center; **AFRIMS:** Armed Forces Research Institute of Medical Sciences; **ANRS:** Agence Nationale de Recherches sur le SIDA; **DoD:** US Department of Defense; **DR:** Dominican Republic; **Guangxi CDC:** Guangxi Centre for Disease Control and Prevention; **HPTN:** HIV Prevention Trials Network; **IAVI:** International AIDS Vaccine Initiative; **KI:** Karolinska Institute; **MI:** Moscow Institute of Immunology; **Thailand MOPH:** Ministry of Public Health Thailand; **MUCHS:** Muhimbili University College of Health Sciences; **MVA:** modified vaccinia Ankara; **NARI:** National AIDS Research Institute in Pune, India; **NV:** Novartis Vaccines; **RFMES:** Russian Federation Ministry of Education and Science; **RPh.:** Richmond Pharmacology; **SGUL:** St. George's, University of London; **SMI:** Swedish Institute for Infectious Disease Control; **St. Jude:** St. Jude Children's Research Hospital; **TAVEG:** Thai AIDS Vaccine Evaluation Group; **USMHRP:** US Military HIV Research Program; **WRAIR:** Walter Reed Army Institute of Research

V - Le VIH- 2

Le VIH-2 est un rétrovirus présentant une organisation génomique semblable à celle du VIH-1, notamment au niveau des gènes *gag*, *pol* et *env*. Les protéines issues des produits des précurseurs Gag, Pol et Env présentent 50 à 55% d'homologie avec celles du VIH-1. L'intégrase et la transcriptase inverse issues du gène *gag-pol* présentent elles 60 % d'homologie avec celles du VIH-1. Le précurseur issu du gène *env*, la gp140 est clivé en protéines gp125 et gp36 qui présentent la même organisation trimérique à la surface de la membrane virale. Les gènes de régulations, *vif*, *nef*, *vpr*, *tat* et *rev* présentent 40% d'homologie avec le VIH-1. En revanche, on ne trouve pas de gène *vpu* chez le VIH-2, il est remplacé par le gène *vpx*. Malgré une organisation du LTR légèrement différente chez le VIH-2, les deux virus présentent un cycle de réplication similaire où la protéine Tat joue un rôle prépondérant.

Le virus VIH-2 est localisé principalement en Afrique de l'ouest. Certains cas ont été localisés en Europe et en Amérique du nord mais le plus souvent sur des sujets venant d'Afrique (Clavel, Mansinho et al. 1987; Arien, Abraha et al. 2005).

VI - Le virus de l'immunodéficience simienne (VIS)

Le virus VIS a une structure qui ressemble fortement, en microscopie électronique, aux virus VIH-1 et VIH-2. La particule virale a un diamètre de 110 à 120 nm. Son organisation génomique est également en grande partie identique à ces deux virus. On trouve les gènes *gag*, *pol* et *env* ainsi que les gènes de régulation *tat*, *nef*, *rev*, *vpr*, *vpu* et *vpx*.

Au niveau homologie de séquence, le SIV présente 80% d'homologie avec le VIH-2 et 40% avec le VIH-1. Cette grande homologie entre le VIS et le VIH-2 a permis d'émettre l'hypothèse d'une inter-infection entre le singe et l'homme.

Les macaques infectés par le virus VISmac présentent les mêmes stades cliniques que ceux observés chez l'homme. Une forte diminution du nombre de lymphocytes T CD4 est observée et on assiste à une lymphadénopathie avec une déplétion lymphocytaire généralisée. Cependant les phases de latence et symptomatiques varient en fonction de la souche de VIS utilisée.

Chapitre II

Entrée du virus VIH-1 dans la cellule cible

I - Protéines impliquées dans le mécanisme de fusion

Le processus de fusion est une étape majeure dans le cycle de réplication du VIH. En effet, c'est à partir de cette étape que le virus va pouvoir entrer dans la cellule hôte et intégrer son génome dans le génome cellulaire à partir duquel il pourra se répliquer. Différentes protéines virales et cellulaires sont impliquées dans ce mécanisme.

A - Protéines virales

1 - Env

La protéine Env est essentielle pour le processus de fusion permettant l'entrée du virus dans les cellules cibles. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur protéique de 160 kDa. Après la synthèse du précurseur gp160, ce dernier est transporté au niveau du réticulum endoplasmique où, débutent la formation de ponts disulfures et la glycosylation. La gp160 contient environ 30 sites de glycosylation globalement bien conservés entre les différents isolats de VIH. Cependant, bien que certains de ces sites doivent être absolument glycosylés pour que la gp160 puisse quitter le réticulum endoplasmique (Fenouillet, Clerget-Raslain et al. 1989), la glycosylation d'autres sites semble facultative (Hemming, Bolmstedt et al. 1994). La glycosylation de la gp160 représente environ 50% de sa masse molaire. Cette glycosylation est très importante pour l'infectiosité des particules virales. Elle est utilisée par le virus comme leurre pour échapper à la reconnaissance par le système immunitaire. En effet, le virus utilise la machinerie de glycosylation de l'hôte pour modifier ses propres protéines. Par conséquent, les protéines virales présentent des structures glycaniques parfaitement identiques à celle du soi. Les virus utilisent aussi cette modification post-traductionnelle pour rendre inaccessibles les épitopes de neutralisation aux produits de la réponse immunitaire (anticorps et CTL CD8) (Botarelli, Houlden et al. 1991; Benjouad, Gluckman et al. 1992). La glycosylation associée à l'action des protéines chaperonnes comme BiP, la calnexine, la calreticulin ou PDI facilite le repliement correct de la protéine (Otteken and Moss 1996; Land and Braakman 2001). Elle a de plus un rôle préventif contre les dégradations dues aux activités protéasiques cellulaires (Papandreou, Idziorek et al. 1996). Par contre la glycosylation ne semble pas avoir de rôle sur l'interaction des glycoprotéines avec le CD4 ou les corécepteurs (Benjouad, Babas et al. 1993; Hemming, Bolmstedt et al. 1994). Si on bloque

cette glycosylation par l'utilisation de la tunamycine qui est un inhibiteur de N-glycosylation, la production de particules virales est inhibée (Pal, Hoke et al. 1989). Par contre, il a été montré que la déglycosylation par traitement enzymatique des glycoprotéines d'enveloppe des VIH-1, VIH-2 et VIS ne semble pas altérer leur capacité à interagir avec le CD4 (Fenouillet, Clerget-Raslain et al. 1989; Benjouad, Babas et al. 1993).

La gp160 est ensuite transportée vers l'appareil de Golgi où elle sera clivée pour donner la gp120 et la gp41 (Land and Braakman 2001). La gp160 est clivée par des endoprotéases cellulaires de la famille des sérine-protéases. *In vitro*, la furine, membre de la famille des pro-hormones convertases (Moulard and Decroly 2000), est capable de cliver la gp160 au niveau d'un site spécifique (REKR₅₁₂↓), conservé dans de nombreux isolats de VIH-1, pour donner les protéines gp120 et gp41. En plus du site potentiel de clivage (REKR₅₁₂↓), la glycoprotéine d'enveloppe présente un deuxième site de clivage (KRR₅₀₅↓) qui ne semble reconnu que dans 15% des cas (Bosch and Pawlita 1990). La furine n'est pas la seule protéase impliquée dans ce clivage, d'autres pro-hormones convertases comme PC7 ainsi qu'un autre groupe d'enzymes sont également capables de maturer la gp160 en gp120 et gp41 (Kido, Kamoshita et al. 1993; Bendjennat, Bahbouhi et al. 2001). Ce processus de clivage est indispensable pour la production de virus infectieux. La modification du site (REKR₅₁₂↓) en site (Y ou F↓) sensible à la chymotrypsine conduit à la production de particules virales qui présentent une morphologie, en microscopie électronique, parfaitement identique à celle du virus sauvage (McCune, Rabin et al. 1988) mais ces particules virales ne sont plus infectieuses. Par contre, les virus produits dans un milieu complétement en chymotrypsine retrouvent leur pouvoir infectieux soulignant ainsi le rôle clé de cette étape de maturation dans le cycle viral (McCune, Rabin et al. 1988).

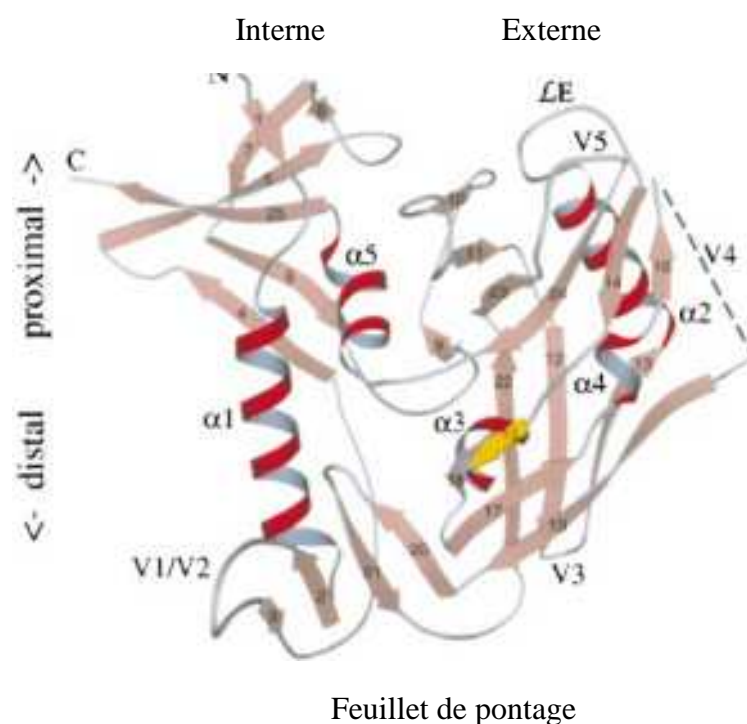
2 - gp120

La protéine gp120, issue du clivage de la gp160 est également appelée protéine de surface (SU). En effet, cette protéine de 120 kDa est exprimée et présentée à la surface des particules virales. Sur le plan structural, elle est constituée d'une partie externe et d'une partie interne qui comprennent des domaines variables (V) et constants (C) (Starcich, Hahn et al. 1986; Willey, Rutledge et al. 1986). On dénombre 5 domaines constants (C1-C5) et 5 domaines variables (V1-V5) (Kwong, Wyatt et al. 1998). Les quatre premiers domaines variables constituent des boucles formées par des ponts disulfures. Les régions constantes constituent le « core » de la glycoprotéine comprenant des structures importantes pour les

interactions avec la gp41 et avec les récepteurs du virus. Ces domaines sont hautement glycosylés, surtout les domaines variables, et semblent interférer avec l'immunogénicité et l'antigénicité de la gp120. Les essais de cristallisation de la gp120 se sont révélés difficiles. Mais l'étude de certaines de ces structures incluant la gp120 déglycosylée associée au CD4, de la gp120 délétée des boucles V1-V3 et tronquée aux extrémités N et C-terminales a permis d'établir la structure générale de la gp120 (Kwong, Wyatt et al. 1998). Le domaine interne est impliqué dans l'interaction avec la gp41 et la formation du trimère. Le domaine externe correspond à une grande structure exposée et fortement glycosylée. La même approche a été aussi utilisée avec la gp120 glycosylée de VIS, délétée au niveau des régions V1-V3 et des fragments N et C terminaux (Chen, Vogan et al. 2005). L'interaction de la gp120 avec le récepteur CD4 induit des changements de conformation provoquant la formation d'un troisième domaine dénommé feuillet de pontage (voir figure 10). Ce domaine comprend deux paires de feuillets β antiparallèles qui relient entre eux les domaines internes et externes. Il joue également un rôle crucial dans l'interaction avec le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 ou CXCR4 (Rizzuto, Wyatt et al. 1998).

Cette protéine joue un rôle essentiel lors de l'infection virale principalement par son implication dans le tropisme du virus et l'initiation du processus de fusion.

Figure 10 : représentation de la structure tertiaire de la gp120. Les hélices α sont représentées de couleur rouge et les feuillets beta de couleur saumon. D'après (Kwong, Wyatt et al. 1998).

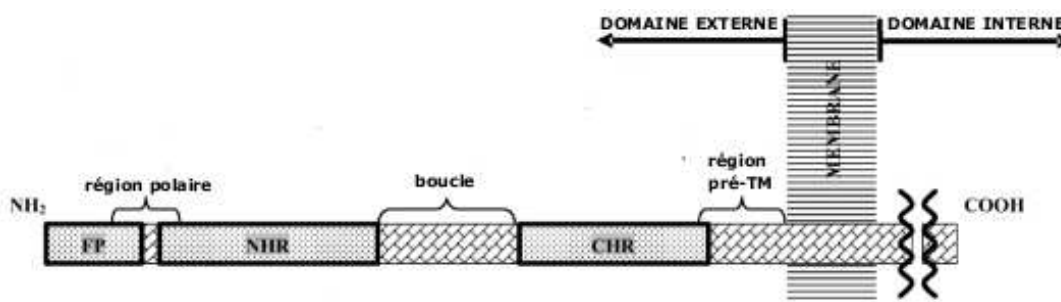


3 - gp41

La gp41 est une glycoprotéine transmembranaire de 41 kDa issue de la maturation de la gp160. Elle possède trois domaines distincts, un domaine cytoplasmique interne, anormalement long comparé à ce qui est observé chez les autres rétrovirus, appelé aussi endodomaine. Il correspond à la partie C-terminale de la gp41. Le deuxième domaine est une région d'ancrage transmembranaire et le troisième domaine, accessible à la surface du virus porte le nom de domaine externe ou ectodomaine. Ce dernier joue un rôle primordial dans le mécanisme de fusion du virus avec sa cellule cible.

Le domaine externe se subdivise en plusieurs sous-régions s'articulant autour de deux domaines principaux, le domaine NHR (ou HRI pour Heptad Repeat 1) et le domaine CHR (ou HRII). On distingue la région pré-transmembranaire (pré-TM), le domaine CHR, une région constituant une boucle flexible, le domaine NHR suivi d'une région polaire et du peptide de fusion.

Figure 11 : Représentation schématique des différents domaines de la gp41. De N en C on peut distinguer le peptide de fusion (PF), les domaines NHR ou HRI et CHR ou HRII séparés par une boucle, la région pré-transmembranaire, la région transmembranaire et l'endodomaine. D'après (Sackett and Shai 2003).

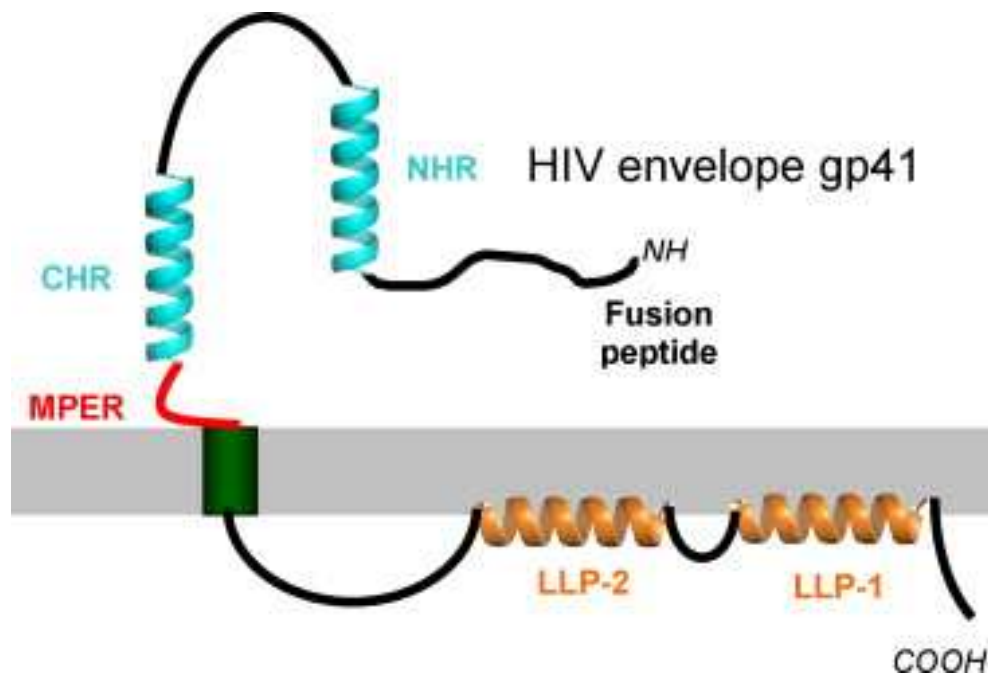


Le peptide de fusion (FP) va permettre (après interaction de la gp120 avec son récepteur et ses co-récepteurs) d'ancrer la partie N-terminale de la gp41 dans la membrane de la cellule cible suivant un modèle semblable à celui utilisé par le domaine HA2 de l'hémagglutinine du virus *Influenza* (Stegmann, Delfino et al. 1991). Les domaines HRI (NHR) et HRII (CHR) comportent des régions répétées et englobent de nombreux sites d'interaction l'un pour l'autre. En effet comme nous le verrons dans le chapitre suivant les

domaines N et C interagissent entre eux pour former des hexamères sous forme d'hélice α (Chan, Fass et al. 1997). Ces domaines d'interaction sont également la cible d'inhibiteurs peptidiques et d'anticorps neutralisants (cf. chapitre 3).

Le domaine interne comprend essentiellement deux peptides appelés peptides lytiques des lentivirus, LLP-1 et LLP2. Ces peptides serviraient entre autres à limiter la fusogénicité de la membrane durant la maturation des glycoprotéines d'enveloppe (Jacobs, Garg et al. 2008).

Figure 12 : représentation des ectodomaines (bleu) et des domaines transmembranaires (vert) et cytoplasmiques (orange) d'un monomère de gp41. D'après (Jacobs, Garg et al. 2008).



B- Protéines cellulaires de l'hôte

Très rapidement après l'isolement du VIH-1, il a été démontré que ce virus présente un tropisme sélectif pour les cellules exprimant le récepteur CD4, essentiellement les lymphocytes T4, les monocytes et les macrophages (Dalgleish, Beverley et al. 1984; Klatzmann, Champagne et al. 1984). D'autres arguments sont venus étayer cette hypothèse,

notamment la déplétion sélective des lymphocytes T4 après infection des cellules mononucléées du sang périphérique. L'observation que le virus infecte uniquement les sous populations de lymphocytes T CD4 positives purifiées alors que les sous populations T CD8 restent non permissives pour le virus va également dans ce sens (Klatzmann, Champagne et al. 1984). L'implication directe de la molécule CD4 comme récepteur a, par la suite, été confirmée par les expériences montrant la capacité de certains anticorps monoclonaux anti-CD4 tel que Leu3a, OKT4A ou de la molécule CD4 recombinante soluble, à bloquer l'attachement et la réplication du VIH-1 (Deen, McDougal et al. 1988; Sattentau and Weiss 1988; Klatzmann, McDougal et al. 1990; Bour, Geleziunas et al. 1995).

La question du mécanisme d'entrée du virus dans sa cellule cible s'est imposée très rapidement. Le virus pouvait entrer, soit par internalisation, soit par fusion membranaire. Les travaux de Maddon et al. (Maddon, McDougal et al. 1988) ont permis de montrer que les molécules de CD4 stablement exprimées à la surface de cellules humaines, préalablement délétées du domaines cytoplasmique responsable de leur internalisation, continuent à interagir avec le virus avec une forte affinité et à médier un cycle productif du virus. Ces travaux montrent clairement que le virus peut toujours pénétrer dans la cellule et s'y répliquer dans ces conditions. Ces expériences montrent donc que le seul mécanisme possible d'entrée du virus est la fusion puisque l'internalisation est complètement bloquée suite à la délétion du domaine intracytoplasmique du CD4.

1 - CD4

Le CD4 est une protéine de 55 kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Elle comprend plusieurs domaines dont un domaine cytoplasmique fortement chargé, un domaine membranaire et 4 domaines extracellulaires distincts (D1 à D4) stabilisés par des ponts disulfures qui s'organisent en feuillets β . Le domaine D1 s'organise en 3 régions appelées CDR (complementary determining region): CDR1 (acides aminés 19 à 24); CDR2 (acides aminés 40 à 53) et CDR3 (acides aminés 87 à 89). Cette molécule est principalement exprimée à la surface des thymocytes et des lymphocytes T auxiliaires (appelés aussi LT helper ou LT auxiliaires), et en plus faible quantité sur les macrophages et les cellules dendritiques. Sa fonction principale est de stabiliser les interactions entre les récepteurs des lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigène par le CMHII. Le site d'interaction avec la gp120 a été initialement identifié dans le domaine extracellulaire sur la région CDR2 (Klatzmann, Champagne et al. 1984; Signoret, Poignard et al. 1993). Le domaine

correspondant sur la gp120 se situe au niveau de C3 et C4 de façon non continue. L'interaction gp120-CD4, en dehors du processus de fusion, a également un effet sur l'état d'activation des lymphocytes T. Outre ces fonctions, le CD4 joue également un rôle inducteur dans le changement conformationnel de la gp120 qui permettra son interaction avec les co-récepteurs.

2 - Les récepteurs aux chimiokines

Depuis la mise en évidence en 1986 de la nécessité d'un corécepteur en plus du CD4 (Maddon, Dalglish et al. 1986) dix années se sont écoulées avant la démonstration de l'implication des récepteurs aux chimiokines dans le mécanisme d'entrée du VIH-1 en 1996. En effet, les premières expériences démontrant cette implication ont été rapportées à partir de 1988 (Walker and Levy 1989). Ces études mettent en évidence la présence de facteurs antiviraux dans le surnageant de clones lymphocytes T CD8+.

Malgré les différentes tentatives d'identification de ces facteurs, il a fallu attendre 1995 pour que certains de ces facteurs soient identifiés (Cocchi, DeVico et al. 1995). Au cours de cette étude, les surnageants cellulaires présentant une activité antivirale ont été purifiés par chromatographie en suivant précisément l'activité antivirale dans chaque fraction purifiée. Après une dernière étape de purification par HPLC, des produits homogènes ont été obtenus. Les fragments peptidiques issus des fractions purifiées ont ensuite subi un clivage enzymatique suivi d'une purification par HPLC avant de déterminer leur séquence en acides aminés.

L'analyse de ces séquences a permis de les identifier comme étant des chimiokines β dont RANTES, MIP1- α et MIP1- β . Ces chimiokines font partie de la famille des cytokines qui sont de petites molécules (8-14 kDa) impliquées dans la régulation du trafic des différents types de leucocytes. Elles agissent principalement sur les neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes et les éosinophiles permettant leur recrutement au niveau des sites d'inflammation. Elles jouent donc un rôle important dans la défense de l'hôte. D'autres rôles ont été décrits par ces chimiokines, notamment dans le développement, l'homéostasie et le fonctionnement du système immunitaire (Nguyen, Giri et al. 2005). Il a été ainsi démontré que ces β chimiokines (RANTES, MIP1- α et MIP1- β) sont capables de bloquer la réplication de certains isolats (isolats primaires appelés aujourd'hui macrophages tropiques ou R5 tropiques) mais sont par contre sans effet sur la réplication d'isolats infectant les lignées lymphocytaires (X4 tropiques) (Jansson, Popovic et al. 1996). Un peu plus tard, des

chimiokines α pouvant inhiber les virus X4 sont identifiées et notamment SDF-1 α (Oberlin, Amara et al. 1996). Cette famille de chimiokines reconnaît un récepteur distinct de celle des β -chimiokines.

La relation entre l'activité antivirale des chimiokines et les corécepteurs du VIH a clairement été démontrée pour la première fois par Feng (Feng, Broder et al. 1996). Dans ces travaux, une banque d'ADNc issue de cellules humaines (HeLa) a été utilisée pour transférer des cellules murines exprimant préalablement le CD4 humain. Après transfection, ces cellules deviennent permissives à l'infection par le VIH-1. L'ADNc impliqué a par la suite été cloné et le récepteur correspondant nommé CXCR4 connu aussi sous le nom de FUSIN ou LESTR. Cependant, ces travaux ont montré que ce récepteur n'est utilisable que par les isolats adaptés pour se répliquer sur les lignées lymphocytaires seulement. Très rapidement, le lien entre la capacité des β -chimiokines à bloquer les virus macrophages tropiques et le récepteur CCR5 a été établi. En utilisant la même approche que celle décrite par Feng, plusieurs équipes ont démontré que la transfection de l'ADN codant pour le récepteur CCR5 dans une lignée cellulaire non humaine mais exprimant le CD4 deviennent permissives à l'infection par des isolats de virus macrophages tropiques (Alkhatib, Combadiere et al. 1996; Deng, Liu et al. 1996).

Les récepteurs des chimiokines appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ils sont classés en 4 familles : CCR, CXCR, CX3CR et XCR. Cette classification est faite en fonction de la position des cystéines en N-terminal situées sur leurs ligands. Par exemple, lorsque les deux premières cystéines du ligand sont contiguës, elles ont pour récepteur les CCR. Si, par contre, elles sont séparées par un seul acide aminé alors le récepteur utilisé sera le CXCR.

Sur un plan structural, les récepteurs aux chimiokines présentent 25 à 80% d'homologie de séquences d'acides aminés (aa) avec un gène ancêtre commun. Ils se caractérisent par :

- Une séquence primaire composée de 340 à 370 aa.
- Une extrémité N-terminale riche en aa acides.
- La deuxième boucle cytoplasmique de leur structure présente un domaine conservé.
- La troisième boucle intracellulaire est plus courte.
- Chaque domaine extracellulaire contient une cystéine.

a- Le CCR5

Le gène de CCR5, localisé dans le chromosome 3p21, contient une seule phase ouverte de lecture qui code pour un polypeptide de 352 aa (Combadiere, Ahuja et al. 1996; Rapport, Gosling et al. 1996; Samson, Labbe et al. 1996). Plusieurs variants non fonctionnels de CCR5 ont également été décrits (Ansari-Lari, Liu et al. 1997; Carrington, Kissner et al. 1997).

Ce récepteur est exprimé par des cellules du système immunitaire telles que les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques immatures, les lymphocytes T mémoires ou Th1, des cellules de Langherans. Il est également présent sur d'autres types cellulaires, on en trouve ainsi sur les fibroblastes, les cellules épithéliales, les neurones, les astrocytes et les cellules de la microglie (Blanpain, Libert et al. 2002).

L'absence d'expression de ce récepteur chez les souris KO n'est pas létale. De plus certaines résistances à l'infection chez l'homme sont dues à une mutation sur un ou deux allèles du gène codant pour CCR5 qui n'est donc pas exprimé chez ces individus (Liu, Paxton et al. 1996).

Au niveau de sa structure, le CCR5 se caractérise par : i) des résidus de cystéine impliqués dans la formation de ponts disulfures au niveau des domaines externes et participant à la stabilisation de la conformation de ce récepteur, ii) la deuxième boucle interne comprenant le domaine DRYLAVHA impliquée dans l'interaction avec les protéines G, iii) des motifs riches en acides aminés chargés localisés au niveau de la troisième boucle interne.

L'interaction de CCR5 avec son ligand semble médiée par sa région N-terminale et sa deuxième boucle externe E2 qui reconnaissent les domaines N-terminal ainsi que la région proche du premier feuillet de la chimiokine β (Zhou, Luo et al. 2000). La délétion de la région N-terminale des β chimiokines s'accompagne par une inhibition de leur activité biologique sans toutefois altérer leur capacité à interagir avec le récepteur. Cette propriété a initié, le développement d'analogues de chimiokines doués d'activité anti-VIH (Nishiyama, Murakami et al. 2002; Pastore, Picchio et al. 2003; Gaertner, Lebeau et al. 2008).

Plusieurs groupes de chercheurs ont rapporté que les récepteurs CCR5 sont essentiellement localisés au niveau des rafts ou radeaux lipidiques qui constituent des domaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides. Cette localisation semble essentielle pour l'entrée du virus et la formation de domaines de signalisation pour la cellule (Manes, Mira et al. 1999; Popik, Alce et al. 2002; Gomez-Mouton, Lacalle et al. 2004;

Nguyen, Giri et al. 2005). Cependant, d'autres travaux ont montré que cette localisation de CCR5 au niveau des rafts n'était pas forcément nécessaire et ce malgré la palmitoylation de ces derniers (Percherancier, Lagane et al. 2003). Il est à noter que cette modification au niveau des cystéines semble faciliter l'adressage vers les radeaux lipidiques. Le CD4, par exemple, se localise au niveau des rafts après sa palmitoylation (Fragoso, Ren et al. 2003). D'autres études ont mis en évidence que la palmitoylation des CCR5 n'est, par contre, pas nécessaire pour rendre les cellules permissives au VIH (Blanpain, Wittamer et al. 2001). Cette observation ne corrèle pas avec les expériences montrant une inhibition de l'infection de cellules préalablement déplétées en cholestérol. Cependant, cette déplétion en cholestérol peut interférer avec la capacité de fusion des membranes et également agir sur la structure et les propriétés d'interaction du CCR5 (Nguyen and Taub 2002).

La même controverse est retrouvée dans la littérature au sujet de la nature oligomérique ou non du CCR5. En effet, des travaux ont montré qu'après interaction avec son ligand, le CCR5 adopterait une conformation en homo et hétérodimères (Lemay, Marullo et al. 2005). Cette dimérisation, qui pourrait être induite par des anticorps ou la fixation des chimiokines, semble bloquer l'infection par le VIH-1 (Vila-Coro, Mellado et al. 2000; Rodriguez-Frade, del Real et al. 2004). D'autres groupes ont montré que, contrairement à cette dimérisation induite, le CCR5 pourrait adopter une conformation dimérique sans interaction préalable avec les chimiokines (Hernanz-Falcon, Rodriguez-Frade et al. 2004). Cette dimérisation constitutive s'apparenterait alors à ce qui a été observé pour le récepteur TLR. Toutefois, l'interaction avec les ligands pourrait intervenir en déclenchant un changement de conformation permettant le recrutement des différents cofacteurs nécessaires à la transduction du signal.

La stimulation de CCR5 par ses ligands conduit à sa phosphorylation et à son internalisation par endocytose (Signoret, Pelchen-Matthews et al. 2000). Le CCR5 s'accumule dans les endosomes primaires avant d'être recyclé à la surface de la membrane plasmique après sa déphosphorylation (Signoret, Pelchen-Matthews et al. 2000). Ce phénomène d'internalisation ne semble pas être impliqué dans le mécanisme d'entrée du VIH-1. Cependant, la régulation négative de CCR5 au niveau de la surface membranaire participe de manière significative à l'activité antivirale des chimiokines contre le VIH-1 (Amara, Gall et al. 1997; Mack, Luckow et al. 1998). En accord avec ces observations, il a été montré que des mutants de CCR5 déficients pour l'internalisation restent opérationnels pour médier l'entrée du VIH-1 mais en contrepartie l'activité antivirale des chimiokines telles que MIP1- β se trouve fortement réduite, jusqu'à 80%.

b - Le CXCR4

Le gène codant pour le corécepteur CXCR4 est porté par le chromosome 2q21 chez l'homme. Ce gène est composé de deux exons de 103 et 1503 pb séparés par un intron de 2132 pb (Caruz, Samsom et al. 1998). Ce récepteur, composé de 352 aa, est exprimé à la surface des neutrophiles, des monocytes, des lymphocytes B et T, des précurseurs des lymphocytes B, des macrophages et des cellules de Langherans. Les cellules endothéliales, les neurones, les cellules de la microglie et les astrocytes expriment aussi CXCR4 (Feng, Broder et al. 1996). Le ligand principal de CXCR4 est le SDF-1 α (Stromal Cell Derived Factor). L'activation du CCR5 par le SDF-1 α est impliquée dans différentes fonctions dont la migration et le recrutement des lymphocytes T, l'hématopoïèse, le développement et l'embryogenèse. Des travaux ont montré que des souris KO pour l'expression du CXCR4 ne sont pas viables. Ces souris souffrent de troubles au niveau des systèmes vasculaires et gastro-intestinal et présentent des malformations du tissu cérébelleux. Notons que les séquences des gènes *CXCR4* et *SDF-1 α* humains et murins présentent une forte homologie, 94% pour le *CXCR4* et 98% pour le *SDF-1 α* .

Sur le plan structural, le CXCR4 présente des caractéristiques similaires à celles du CCR5 et la même controverse, voire plus virulente, est retrouvée au sujet de sa localisation ou non, au niveau des rafts. On peut expliquer en partie une telle différence de résultats et de conclusions par la diversité des approches utilisées et des types cellulaires employés pour purifier les rafts.

CXCR4 semble former des multimères dans les cellules au repos. Son activation par SDF-1 α ou la gp120 de VIH-1 ne modifie pas cette oligomérisation (Babcock, Farzan et al. 2003; Toth, Ren et al. 2004). Cependant, une étude plus récente montre que CXCR4 forme des dimères constitutifs et des hétérodimères avec CCR2 (Percherancier, Berchiche et al. 2005).

Comme pour CCR5, le CXCR4 est internalisé par endocytose suite à la stimulation par SDF-1 α . Toutefois, dans ce cas, l'internalisation induite par SDF-1 α est 5 à 10 fois plus rapide que pour CCR5. Cette différence de cinétique semble être liée à des facteurs structuraux localisés au niveau de l'extrémité C-terminale de CXCR4 (Venkatesan, Rose et al. 2003).

In vitro, VIH et VIS peuvent utiliser d'autres co-récepteurs comme CCR2b, CCR3, CCR8, APJ, Bonzo (STRL33), BOB (GPIR15) et US28 (CMV) (Singh, Besson et al. 1999). Le récepteur CCR2b est exprimé essentiellement à la surface des monocytes et des cellules Natural Killer (NK) (Sica, Saccani et al. 1997), CCR3 est retrouvé au niveau des éosinophiles, des cellules de la microglie et certains sous-types de lymphocytes T (Combadiere, Ahuja et al. 1995) et CCR8 localisé à la surface des monocytes, lymphocytes et neutrophiles activés (Tiffany, Lautens et al. 1997). STLR33, exprimé à la surface des lymphocytes T (Liao, Alkhatib et al. 1997) est utilisé par le virus VIS et à moindre échelle par le VIH (Deng, Unutmaz et al. 1997). Le récepteur APJ (Choe, Farzan et al. 1998), présent au niveau des cellules neurales ainsi que le récepteur US28 qui est un récepteur des chimiokines codé par le CMV (Pleskoff, Treboute et al. 1997) peuvent également être utilisés par le VIH et VIS.

II- Etape d'entrée du VIH-1

La première étape du cycle viral du VIH-1 est médiée par l'attachement du virus à son récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 ou CXCR4. L'étape d'entrée proprement dite commence juste après cette interaction. Elle consiste en la fusion des membranes virales et cellulaires. Toutes ces étapes clés du cycle viral représentent des cibles potentielles pour le développement de molécules antirétrovirales.

A - Attachement gp120-CD4

La première étape de cet attachement consiste en l'interaction entre la gp120 et le récepteur CD4. La gp120 se trouve sous forme trimérique à la surface de la particule virale. Elle est liée au virus grâce à des interactions non covalentes avec la glycoprotéine transmembranaire gp41. Le CD4 est exprimé principalement à la surface des lymphocytes T CD4, des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques. L'interaction gp120-CD4 se fait avec une forte affinité et permet la formation d'un complexe gp120-CD4 dont on commence à connaître la nature des interactions impliquées grâce à la résolution d'une partie de sa structure tridimensionnelle par diffraction aux rayons X (Kwong, Wyatt et al. 1998). Cette interaction nécessite la présence de plusieurs trimères de gp120 et dépend de la densité des récepteurs CD4 présents à la surface de la cellule. L'interaction gp120-CD4 entraîne de nombreuses modifications structurales au niveau de la gp120. Les deux principales modifications structurales concernent une dissociation entre la gp120 et la gp41 ainsi qu'une

modification conformationnelle de la boucle V3 (Sattentau and Moore 1991) qui induit la formation d'un site d'interaction avec le co-récepteur CCR5. Ces modifications entraînent l'exposition de différents épitopes, cibles d'anticorps comme le 17b ou le 48D (Thali, Moore et al. 1993), principalement localisés dans ou à proximité de la boucle V3.

La fixation du CD4 provoque aussi un mouvement de la boucle V1/V2 qui masque partiellement la boucle V3. La boucle V3 devient alors accessible, révélant des épitopes reconnus par les anticorps précédemment cités. La fixation du CD4 permet aussi un renforcement et une stabilisation du domaine charnière ainsi qu'un changement d'orientation des parties N et C terminales de la gp120 déstabilisant ainsi l'interface gp120-gp41. Une dissociation de la gp120 et de la gp41 est aussi observée (Moore, McKeating et al. 1990). L'accessibilité de la boucle V3 engendrée par ces remaniements conformationnels permet son interaction avec les co-récepteurs CCR5 ou CXCR4.

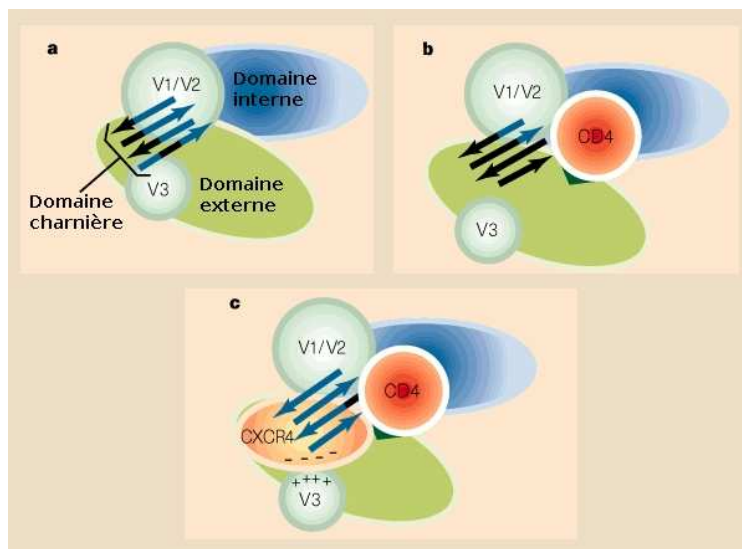
Le virus VIH-1 peut aussi s'adsorber à la surface membranaire à l'aide d'autres récepteurs cellulaires tels que les héparanes sulfates présents à la surface de différents types cellulaires (Ji, Gewurz et al. 2005). Cette interaction pourrait jouer un rôle important dans la concentration du virus au niveau des cellules cibles facilitant ainsi les rencontres gp120/CD4/CCR5 ou CXCR4.

La gp120 peut également utiliser le récepteur DC-SIGN (Dendritic Cell Specific ICAM-3 Grabbing nonintegrin). Ce récepteur est une lectine de type C, indépendante du calcium. Elle est exprimée à la surface de certaines cellules telles que les cellules dendritiques et les macrophages. L'interaction gp120-DC-SIGN se fait avec une forte affinité ($K_d=1,4nM$) (Curtis, Scharnowske et al. 1992; Halary, Amara et al. 2002). Cette interaction a lieu grâce aux groupements mannose des chaînes glycaniques de la gp120 (Geijtenbeek, van Vliet et al. 2001; Geijtenbeek and van Kooyk 2003). Elle semble jouer un rôle important dans le transfert du virus de la surface des muqueuses vers les ganglions lymphatiques (Geijtenbeek, Kwon et al. 2000). Le virus, repéré par les cellules dendritiques au niveau des muqueuses vaginales, peut alors être lié via DC-SIGN aux cellules dendritiques. Ces cellules vont transporter le virus jusqu'aux ganglions lymphatiques où il sera présenté aux lymphocytes helper TCD4, entraînant ainsi leur infection. Cependant, le rôle exact de ce mécanisme dans la transmission et la physiopathologie de l'infection reste encore débattu.

Même si en général, l'infection passe par CD4, plusieurs auteurs ont rapporté des cas d'infections de cellules qui n'expriment pas ce récepteur. C'est le cas notamment des

neurones, des astrocytes, des cellules endothéliales, des cellules épithéliales, des lymphocytes CD4-, des thymocytes et des cardiomyocytes. Des récepteurs alternatifs ont été également proposés, incluant des glycolipides comme le galactosylcéramide, des lectines, le récepteur Fc des immunoglobulines et le récepteur au complément. Cependant, certains travaux ont montré que la coculture de cellules CD4+ infectées par le VIH-1 avec des cellules CD4- (astrocytes, neurones) permettait la transmission du virus à ces cellules par contact (Speck, Esser et al. 1999; Alvarez Losada, Canto-Nogues et al. 2002). Des travaux plus récents montrent également que le VIH-1 pourrait entrer par endocytose. Suivant le type cellulaire concerné, cette voie d'entrée peut conduire à la production de virions infectieux (Fackler and Peterlin 2000; Marechal, Prevost et al. 2001; Daecke, Fackler et al. 2005) ou non infectieux lorsque le virus est endocyté par les cellules dendritiques (Cavrois, Neidleman et al. 2006).

Figure 13 : Représentation des changements conformationnels de la gp120 se déroulant après son interaction avec le CD4 et ses corécepteurs. a : position initiale, le domaine charnière est représenté par les flèches bleues. b : interaction avec le CD4 induisant un éloignement des boucles V1/V2 et V3 du domaine charnière libérant ainsi ce dernier. c : interaction du corécepteur au niveau du domaine charnière et de la boucle V3. La charge et/ou la conformation de la boucle V3 influenceront sur le choix du corécepteur. d'après (Moore and Binley 1998).



B - Interaction gp120/CCR5 ou CXCR4

Comme il a été évoqué, le complexe gp120-gp41-CD4 nécessite soit le corécepteur CCR5 soit le corécepteur CXCR4 pour poursuivre le processus de fusion. La formation du pore de fusion nécessite au moins 4 à 6 molécules CCR5 ainsi que plusieurs molécules de CD4 (Kuhmann, Platt et al. 2000).

L'interaction gp120/corécepteurs induit de nouvelles modifications conformationnelles conduisant à l'exposition du domaine externe de la gp41 contenant le peptide de fusion (localisé dans la région N-terminale de la gp41) qui pourra alors s'ancrer dans la membrane de la cellule cible. De plus, des interactions directes entre le co-récepteur et le CD4 ont été démontrées (Hill, Deng et al. 1997). Ces interactions contribuent à stabiliser le domaine charnière.

Cependant, l'ensemble des liaisons n'est pas encore caractérisé. Ces différentes interactions impliquant différents domaines de la gp120, de la gp41, du CCR5 et du CXCR4 se déroulent suivant un processus dynamique.

C- Mécanisme de fusion/rôle de la gp41

La gp41 joue un rôle actif dans le processus de fusion. Elle existe sous deux formes conformationnelles, une forme native ou non fusogénique lorsqu'elle est associée à la gp120 dans la particule virale et sous une forme fusogénique. Cette dernière apparaît lorsque la gp120 interagit avec les récepteurs cellulaires, induisant les différents changements de structure pour ensuite se dissocier de la gp41.

Les événements internes conduisant à ces modifications ne sont pas encore parfaitement caractérisés, cependant l'enchaînement des événements et les stades intermédiaires ont pu être décrits.

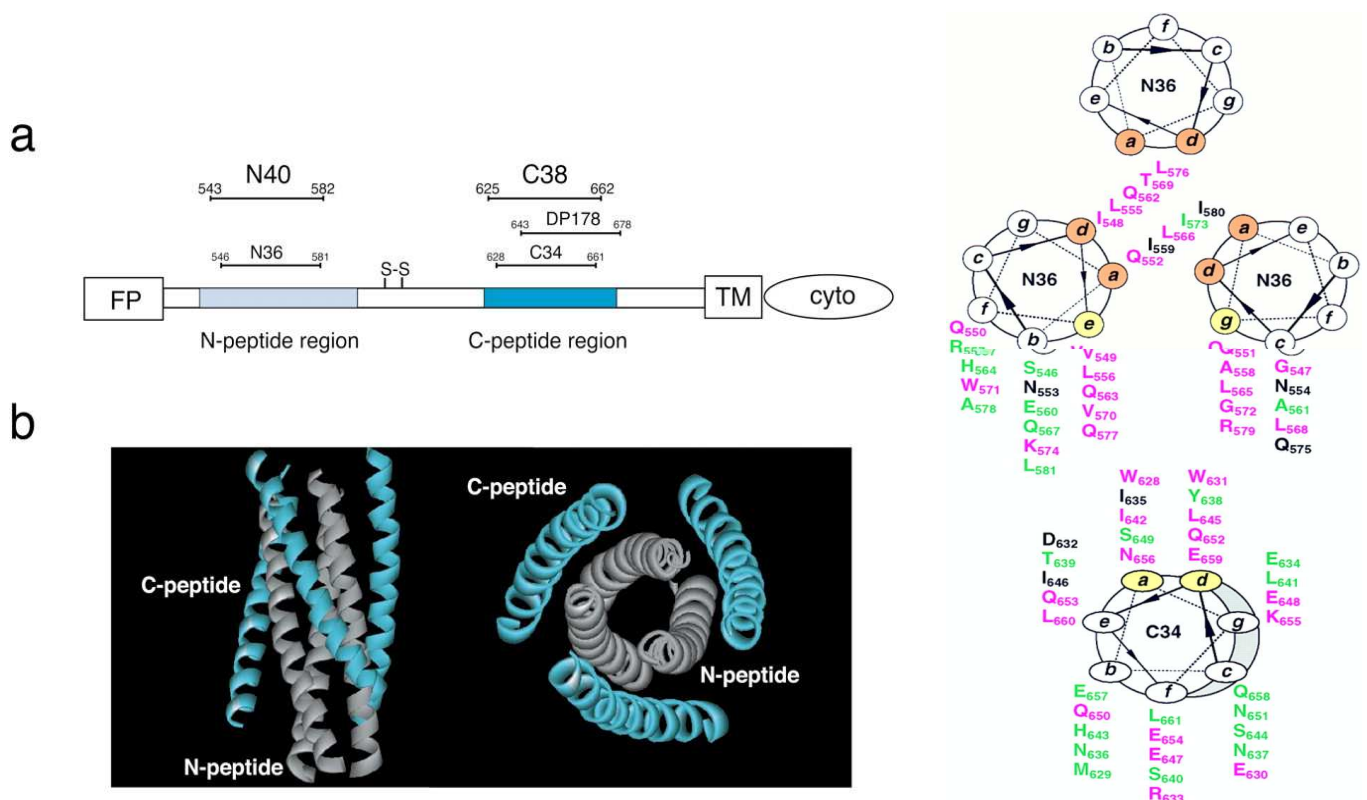
Le premier stade se déroulant après la dissociation de la gp120 est l'exposition du peptide de fusion se situant à l'extrémité N-terminale de l'ectodomaine de la gp41. Ce peptide de fusion hydrophobe devient accessible et interagit avec la membrane de la cellule cible suivant un mécanisme semblable à celui décrit pour l'hémagglutinine du virus de la grippe (Influenza) (Dimitrov, Rawat et al. 2003) excepté en ce qui concerne le pH qui n'intervient pas dans le cas du VIH.

Le stade suivant est directement lié à des changements dans la structure tridimensionnelle de la gp41 durant le stade fusogénique. L'ectodomaine de la gp41, précédemment décrit, comprend deux domaines, HRI et HRII. Le domaine HRI (ou NHR ou N36) est situé dans la région N et le domaine HRII (ou CHR ou C34) dans la région C de l'ectodomaine.

Ces deux domaines sont structurés sous formes de trimères (3 domaines C et 3 domaines N) structurés en hélices alpha.

Cette structure a été déterminée par diffraction aux rayons X des fragments peptidiques cristallisés des domaines HRI et HRII. La résolution de cette structure (35 Å de diamètre sur 55 Å de longueur) montre que les deux régions HRI et HRII interagissent entre elles pour former un complexe de 6 hélices alpha où les domaines N et C forment 2x3 épingles à cheveux (hairpins) orientées de façon antiparallèles (Chan, Fass et al. 1997; Weissenhorn, Dessen et al. 1997).

Figure 14 : Représentation de la structure de la gp41. La figure de droite représente une vue schématique des domaines de la gp41 (a) et tridimensionnelle de l'hepta 4-3 hélice vue selon son axe (b). La figure de gauche représente un schéma de l'hélice permettant de voir les 7 positions de (a) à (g) occupées par les différents résidus au sein d'une répétition. Les acides aminés essentiels pour l'interaction (W628, W631, I635) occupent les positions (a) et (d). (Chan, Fass et al. 1997)

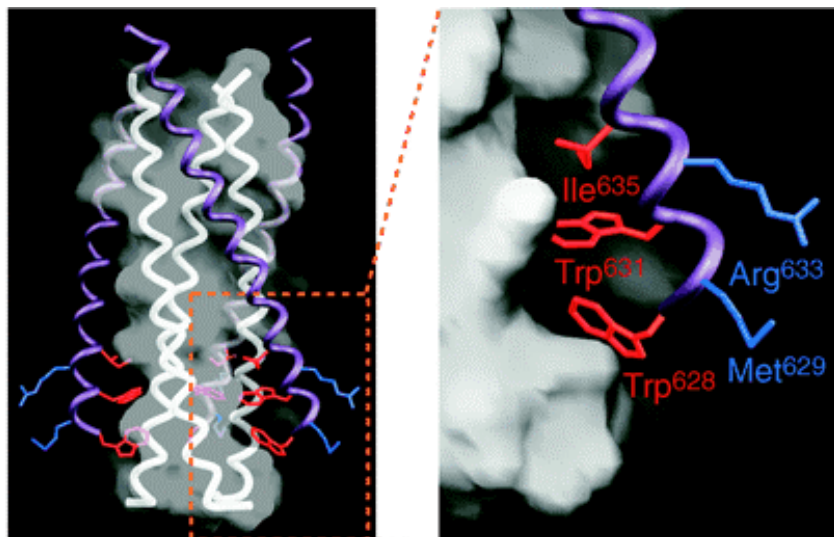


L'interaction des domaines HRI et HRII met en évidence une région d'interaction, particulièrement importante dans le mécanisme de fusion. Il s'agit d'une petite cavité hydrophobe localisée sur le domaine HRI dans laquelle vient se fixer le domaine HRII. Cette interaction fait intervenir certains résidus hydrophobes. Trois acides aminés ont ainsi été identifiés comme essentiels pour cette interaction. Ces 3 résidus, se projetant dans la cavité de N36 ou HRI, correspondent aux tryptophane 628, 631 et à l'isoleucine 635 présents sur le peptide C34 ou HRII.

La mutation de ces résidus s'accompagne d'une perte de l'interaction du domaine HRII avec le domaine HRI (Chan, Chutkowski et al. 1998; Weng and Weiss 1998). En effet, la substitution des tryptophanes 628 et 631 et de l'isoleucine 635 par des alanines conduit à une perte de stabilité du complexe et de l'hélice α formée par les domaines C et N. Par exemple, dans le cas de la mutation du tryptophane 631, le T_m (« temperature melting » qui rend compte de la température au delà de laquelle le complexe HRI-HRII ne peut plus se former) du complexe passe de 66°C pour la forme sauvage à moins de 31°C pour la forme mutée.

De plus, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, cette zone d'interaction constitue une cible de choix pour la conception et le développement d'inhibiteurs peptidiques capables de bloquer l'entrée du virus en interférant avec l'interaction entre HRI et HRII.

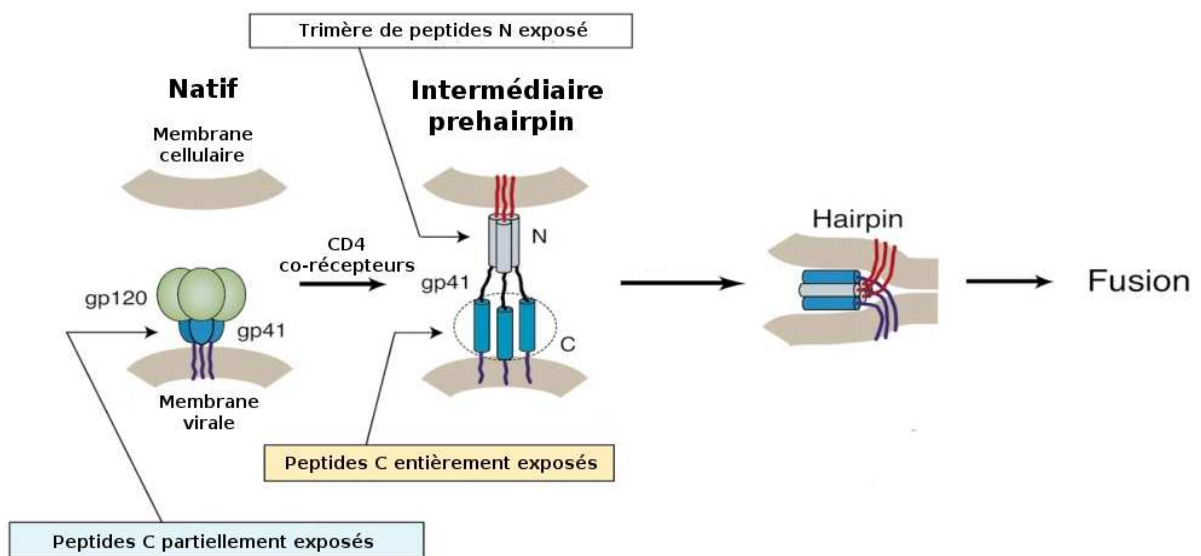
Figure 15 : Représentation tridimensionnelle de la poche hydrophobe créée par deux résidus de HRI (gris) et interaction avec les acides aminés essentiels (rouge) du domaine HRII (violet) (Chan, Chutkowski et al. 1998).



Préalablement à la formation de ce complexe, on observe un stade intermédiaire désigné sous le nom de « pre-hairpin ». Les deux domaines N et C sont distincts, le domaine C étant ancré du côté de la membrane virale et le domaine N ancré du côté de la membrane de la cellule cible grâce au peptide de fusion (Chan, Chutkowski et al. 1998; Chan and Kim 1998; Melikyan, Markosyan et al. 2000). Ce stade intermédiaire qui correspond à une étape transitoire, disparaît très rapidement au profit du stade fusogène ou hairpin. En effet, l'affinité des domaines N et C va induire un repliement rapide de la gp41. Les deux domaines interagissant entre eux vont se rapprocher et entraîner la membrane plasmique qui leur est associée provoquant ainsi son rapprochement avec la membrane virale.

L'enveloppe du virus VIH est formée à partir de la membrane lipidique de la cellule d'où le virus a bourgeonné. Elle est par conséquent constituée, en plus des glycoprotéines virales, des mêmes composants que la membrane plasmique des cellules permissives au VIH. Le rapprochement des deux membranes va conduire à la fusion de ces dernières, probablement au niveau des rafts (bien que cela reste controversé) qui constituent des domaines beaucoup plus fluides des membranes plasmiques (Liao, Cimasky et al. 2001).

Figure 16 : Représentation schématique du processus de fusion. Après interaction de la gp120 avec le CD4 et les corécepteurs, un changement conformationnel de la gp41 conduit à l'exposition de ces domaines N (HRI) et C (HRII) au stade pre-hairpin. Ce stade, très transitoire, précède la fusion qui se réalise après rapprochement et interaction des deux domaines. D'après (Chan and Kim 1998).



Plusieurs complexes gp120-CD4 sont impliqués au niveau du site de fusion. Le rapprochement et l'interaction des parties N et C terminales de la gp41 vont induire le rapprochement des membranes permettant la création d'un pore de fusion au travers duquel la capsid virale va pouvoir pénétrer dans la cellule cible.

Chapitre III

Inhibiteurs d'entrée du virus

Le processus d'entrée du VIH étant une étape clef dans le cycle de réplication virale, de nombreux travaux ont été effectués afin de trouver un moyen de le bloquer. Cette étape fait intervenir différentes molécules, aussi bien présentes à la surface du virus (gp120, gp41) que de la cellule cible (CD4, corécepteurs). Ces dernières représentent donc autant de cibles potentielles pour la conception d'inhibiteurs.

Différents types d'inhibiteurs ont été étudiés et mis au point avec plus ou moins de succès. On peut distinguer des inhibiteurs de type immunologiques comme des anticorps dirigés contre les différentes protéines entrant en jeu dans la fusion, des inhibiteurs de type peptidiques agissant la plupart de temps par effet antagoniste avec les domaines peptidiques qu'ils miment et enfin des inhibiteurs chimiques.

I - Les anticorps

Plusieurs anticorps capables de bloquer l'infection VIH-1 ont été décrits. Ces anticorps agissent en se fixant soit au CD4, soit à la gp120. On y trouve notamment le pro-542 qui est une protéine de fusion recombinante où les fragments variables des chaînes lourdes et légères d'une IgG2 ont été remplacés par 4 exemplaires du domaine d'interaction du CD4 avec la gp120 (Allaway, Davis-Bruno et al. 1995). Cette protéine, en se fixant sur la gp120, empêche son interaction avec le CD4. Elle est capable de neutraliser de nombreuses souches virales. Les essais chez l'homme ont montré que cette molécule peut être tolérée chez l'homme avec une demi-vie plus longue, de 3 à 4 jours, que celle obtenue avec la molécule CD4 soluble seule (Vermeire et al 2004).

La boucle V3 de la gp120, et particulièrement la région comprise entre les résidus 307 et 330 est une région très immunogène capable d'induire des anticorps neutralisants (Goudsmit, Debouck et al. 1988; Palker, Clark et al. 1988). L'immunisation d'animaux avec des peptides mimant la boucle V3 de la gp 120 a en effet permis d'obtenir des anticorps neutralisants le VIH-1 (Palker, Clark et al. 1988; Javaherian, Langlois et al. 1989). Toutefois la boucle V3 de la gp120 est une région très variable d'un isolat de virus à l'autre ce qui pose une limitation dans l'utilisation des anticorps anti-V3. Ces derniers ne peuvent en effet neutraliser que les isolats contre lesquels ils ont été produits.

Cependant, trois anticorps monoclonaux humains, b12, 2G12 et 2F5 se sont révélés particulièrement intéressants pour leur capacité à neutraliser un large spectre d'isolats

primaires de VIH-1. Au niveau de sa spécificité, l'anticorps b12 reconnaît un épitope discontinu dans la gp120. Cet épitope chevauche le site d'interaction avec le CD4 (Roben, Moore et al. 1994; Saphire, Parren et al. 2001). L'anticorps b12 neutralise 50% d'un ensemble de 90 isolats primaires testés. La majorité des virus neutralisés est de sous type B (72%).

L'anticorps 2G12 est spécifique d'un épitope glycanique de type mannose localisé sur la gp120 au niveau de 3 sites de N-glycosylation (Sanders, Venturi et al. 2002; Scanlan, Pantophlet et al. 2002). Cet anticorps neutralise 40% de ce même pool d'isolats primaires de VIH-1. Toutefois, il n'a aucun effet neutralisant sur les isolats de type C ou E. L'activité non neutralisante du 2G12 sur les sous-types C est en accord avec l'absence du site de N-glycosylation en position 295 en N-terminal de la boucle V3. Ce site de N-glycosylation est absent dans plus de 83% des virus de sous-type C. Cependant, la réintroduction de ce site par mutagenèse dirigée restaure la sensibilité à la neutralisation chez 1/3 des virus de sous-type C par l'anticorps 2G12 (Gray, Moore et al. 2007). Ce résultat suggère que des facteurs structuraux sont aussi nécessaires en plus de l'importance de la glycosylation au niveau du site Asparagine 295.

L'anticorps monoclonal 2F5 reconnaît un épitope localisé dans l'ectodomaine de la gp41, D₆₆₄KW₆₆₆, adjacent à celui reconnu par l'anticorps 4E10. Il neutralise 67% des isolats testés mais reste sans effet sur les virus de sous-type C. Notons que la Lysine 665 n'est conservée que dans 12% des virus de sous-type C.

L'anticorps monoclonal (AcM) b12 a été également testé pour sa capacité à bloquer la transmission par voie vaginale chez le macaque Rhésus du virus SHIV. SHIV est un virus chimère VIH/VIS présentant un tropisme R5. Chez 9 macaques sur 12, la transmission du SHIV a été bloquée par cet anticorps (Veazey, Shattock et al. 2003).

Les anticorps AcM 2G12 et 2F5 ont aussi été testés chez le macaque par injection par voie intra-veineuse. L'AcM 2G12 administré seul ou en association avec l'AcM 2F5 ne confère qu'une protection partielle (8 macaques sur 14) après infection par voie vaginale d'un virus SHIV X4 tropique (Mascola, Stiegler et al. 2000).

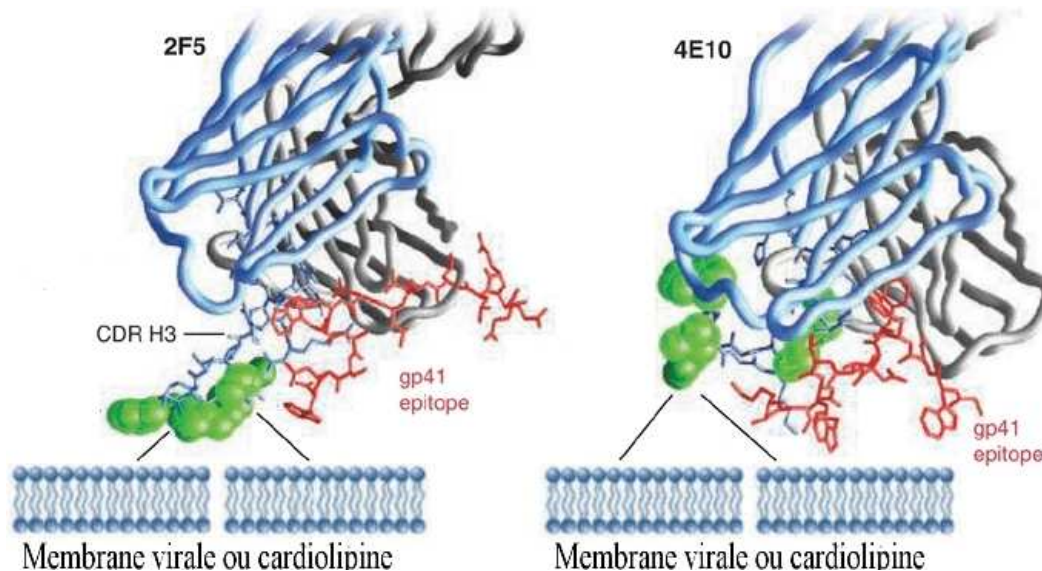
La neutralisation des virus par les anticorps peut avoir des applications cruciales si elle vise les premières étapes, au niveau du contact virus-cellules. L'une des perspectives les plus importantes serait de poursuivre le développement de ces anticorps pour les utiliser dans la composition de microbicides. Cependant, il reste un défi majeur à relever qui consiste à

comprendre comment modéliser des immunogènes capables de stimuler des anticorps avec la même spécificité.

D'autres anticorps dirigés contre les corécepteurs sont en développement. C'est le cas notamment de l'anticorps monoclonal PRO140 dirigé contre le CCR5. Cet anticorps inhibe totalement tous les isolats R5 mais n'a aucun effet contre les isolats X4 tropiques (Cilliers, Nhlapo et al. 2003).

Figure 17 : Interaction des anticorps 2F5 et 4E10 avec la membrane et la gp41. La gp41 est présentée en rouge et le domaine hydrophobe CDR de l'anticorps en vert.

D'après (Nabel 2005).



II - Inhibiteurs chimiques

Plusieurs molécules chimiques ont été élaborées pour interférer sur l'interaction gp120-CD4, gp120-corécepteurs ainsi que sur la gp41 (voir tableaux 4 et 5).

Le BMS-378806 et le BMS-488043 sont des molécules qui se fixent sur la gp120 avec une stœchiométrie de 1 et bloquent complètement l'interaction avec le CD4. Leur IC50 (concentration inhibant 50% de la réplication virale) est de l'ordre du nM. Ils sont actifs aussi bien sur les virus à tropisme macrophagique que sur les virus à tropisme lymphocytaire. Testé en phase I, le BMS806 s'est avéré peu efficace in vivo et son développement fut arrêté contrairement au BMS043 qui a donné des résultats particulièrement encourageants (Ho, Fan

et al. 2006). Les molécules NBD-556 et NBD-557 sont de petites molécules analogues de l'oxalamide N-phenyl-N'-(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-yl). Ces molécules interagissent avec la gp120 et empêchent sa fixation au CD4. Elles sont particulièrement actives sur les isolats de laboratoire avec une IC50 de l'ordre du μM mais moins efficaces sur les isolats primaires (Zhao, Ma et al. 2005). Le NSC 13778 est une autre petite molécule qui se fixe au domaine D1-D2 du CD4 empêchant ainsi l'interaction avec la gp120. Son efficacité est de l'ordre du μM . Il est actif aussi bien sur les isolats R5 que X4 (Yang, Stephen et al. 2005). La molécule CADA (macrocycle cyclotriazadisulfonamide) n'agit pas directement sur l'interaction gp120 ou CD4, mais module négativement l'expression du CD4 à la surface des cellules. Actif avec des concentrations de l'ordre du μM , son effet est réversible (Vermeire and Schols 2005). De plus, le CADA semble être un bon candidat pour être utilisé en tant que microbicide. En effet il a été démontré que le blocage du CD4 au niveau du tissu cervical (*ex vivo*) inhibait complètement la réplication du VIH (Hu, Frank et al. 2004). De par sa faible masse moléculaire et son activité, le CADA semble donc être un composant idéal dans la conception de gels microbicides permettant de prévenir l'infection par le VIH.

Des molécules hybrides ont également été étudiées. On trouve notamment la molécule chimère sCD4-17b qui comprend les domaines D1-D2 du CD4 liés à l'anticorps humain mAb 17b par un peptide de liaison. Bien qu'il soit actif sur un large spectre d'isolats de VIH, certains isolats primaires semblent pourtant résistants (Dey, Del Castillo et al. 2003).

Des études *in vitro* utilisant le BMS-806 et ses analogues ont montré l'apparition d'isolats résistants à ces inhibiteurs. Des mutations sur les acides aminés situés en périphérie de la cavité de la gp120 avec laquelle interagissent les inhibiteurs sont responsables de l'apparition de ces résistances. Il s'agit notamment des acides aminés Tryptophanes 112, 257, Serine 375, Phénylalanine 382, Méthionines 426, 434 et 475 (Madani, Perdigo et al. 2004).

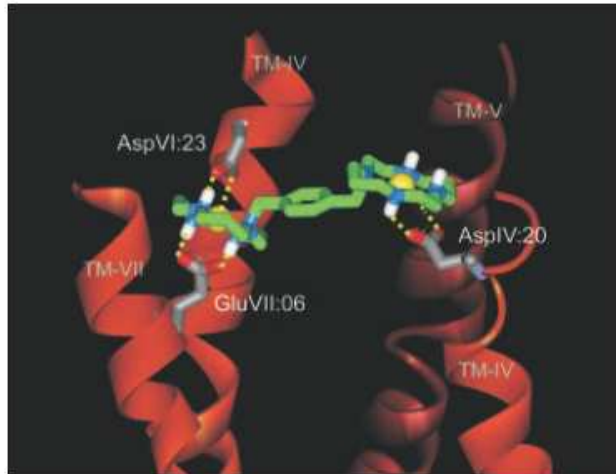
Parallèlement au développement d'inhibiteurs dirigés contre l'interaction gp120-CD4, des molécules agissant sur l'interaction de la gp120 avec les corécepteurs ont été également décrites. La première molécule à être développée fut le TAK-779. Cette molécule se fixe sur le CCR5 au niveau d'une cavité formée par les régions transmembranaires 1, 2, 3 et 7 du corécepteur. Incompatible avec une administration par voie orale, cette molécule est administrée par injection. Bien qu'elle soit active sur les virus R5 tropiques, son développement fut interrompu suite aux réactions provoquées au niveau des sites d'injection. Cependant, des dérivés de TAK-779 ont été développés, comme le TAK-220 (Takashima, Miyake et al. 2005)

ou le TAK-652 (Baba, Takashima et al. 2005). Ces dérivés peuvent être administrés oralement et présentent une forte activité antivirale, ils sont actuellement en phase clinique II.

D'autres petites molécules antagonistes du CCR5 ont été également mises au point. On trouve le SHC-351, le SHC-125, le SHC-417 appelé aussi vicriviroc® ainsi que l'AD101. Toutes ces molécules sont administrables oralement et se fixent au niveau de la cavité transmembranaire du CCR5 bloquant ainsi la fixation de la gp120. Le vicriviroc est actuellement en phase clinique II. D'autres molécules comme l'aplaviroc® (GW-873140) ou le maraviroc® (UK-427857) sont à des stades avancés de leur développement, le maraviroc® venant même d'être approuvé par l'US Food and Drug Administration. Par contre, le développement de l'aplaviroc®, qui interagit avec ECL2 et non avec la cavité membranaire de CCR5, a été stoppé suite à une forte toxicité au niveau du foie (Nichols, Steel et al. 2008).

A côté des molécules antagonistes du CCR5, de petites molécules antagonistes du CXCR4 sont également en cours de développement. L'AMD3100 fut le premier inhibiteur développé. Il s'agit d'un bicyclame [1,11-(1,4-phénylènebisméthylène)-bis-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane octahydrochloride dihydrate], c'est à dire deux cyclames reliés par un pont aromatique. Son mode d'interaction avec le CXCR4 a été étudié (Rosenkilde, Gerlach et al. 2004) et présenté dans la figure 18. Malgré sa forte activité *in vitro* avec une IC50 de l'ordre du nM, les études en phase clinique ont montré des résultats décevants et son développement en tant qu'inhibiteur du VIH a été abandonné (Hendrix, Collier et al. 2004). Cependant, il semble avoir des propriétés intéressantes sur la mobilité des cellules souches et il est utilisé pour faciliter les transplantations d'organes sous le nom de Mozobil™. L'AMD070 qui dérive de l'AMD3100 semble, lui, plus prometteur concernant l'inhibition de la réplication du VIH. En effet, outre son administration par voie orale, son activité antivirale *in vivo* est supérieure à l'AMD3100 (Schols 2004). D'autres inhibiteurs sont actuellement étudiés comme le KRH-1636 qui présente une activité antivirale similaire à l'AMD3100 mais qui est délivrable par voie orale ou le KRH-2731 qui se fixe sur les boucles ECL2 et ECL3 du CXCR4. Ce dernier inhibiteur est particulièrement intéressant car il est actif sur les virus X4 ainsi que sur les virus R5X4 avec une activité dix fois supérieure à celle de l'AMD070.

Figure 18: Interaction de l'AMD3100 avec le CXCR4. Un des cycles de l'AMD3100(Zn^{2+}) interagit avec l'AspIV:20 (Asp171 de CXCR4) alors que l'autre cycle est pris en "sandwich" entre l'AspVI:23 (Asp262 du CXCR4) et la Glu-VII:06 (Glu288 de CXCR4) (Rosenkilde, Gerlach et al. 2004).



Lors de la primo-infection, les isolats de VIH sont surtout R5 tropiques, ce qui rend les inhibiteurs CCR5 particulièrement attractifs pour prévenir l'infection, notamment en les utilisant dans la composition de gels microbicides. Cependant afin d'éviter une sélection de variants R5X4, un mélange comprenant des inhibiteurs de CCR5 et de CXCR4 peut s'avérer particulièrement efficace.

Tout comme avec les inhibiteurs ciblant l'interaction gp120-CD4, des isolats de virus résistant aux inhibiteurs qui ciblent les co-récepteurs sont également apparus. Des mutations sur de nombreuses régions de la gp120, notamment sur les boucles V3 et V2 ainsi que sur les domaines C2 et C4 sont susceptibles d'entraîner l'apparition de ces variants résistants. Les variations de la boucle V3 entre les différents isolats lui permettant d'échapper aux anticorps neutralisants en est un bon exemple (Wolfs, de Jong et al. 1990; Wolfs, Zwart et al. 1991). Des souches résistantes au maraviroc® ont été détectées mais elles restent sensibles à d'autres inhibiteurs de CCR5 comme l'aplaviroc®, le vicriviroc® ou le SCH-C. Cependant, des résistants au vicriviroc® sont également résistants aux dérivés de RANTES, au SCH-C ainsi qu'à l'AD-101. Cette résistance commune peut s'expliquer par le fait que ces inhibiteurs agissent sur les mêmes domaines du CCR5 (Marozsan, Kuhmann et al. 2005). En revanche,

ces variants sont sensibles aux inhibiteurs qui agissent sur l'interaction gp120-CD4. Il a été rapporté également des variants résistants aux inhibiteurs ciblant CXCR4, la plupart du temps associés à des mutations sur la boucle V3 de la gp120.

L'ADS-J1 est une petite molécule cyclique découverte lors de tests ELISA sandwich utilisés pour détecter la formation du complexe 6HB (Jiang, Lin et al. 1999). Cette petite molécule se fixe dans la cavité du N36 reconnue par le C34 et bloque ainsi la formation du complexe HRI-HRII. Cependant ce mécanisme ne serait pas le seul, de récentes études ont montré que ce composé pouvait aussi interagir avec la gp120 (Armand-Ugon, Clotet-Codina et al. 2005; Manetti, Tintori et al. 2006). L'intérêt de cette molécule par rapport à l'approche peptidique réside dans sa faible taille compatible avec une éventuelle prise orale. Cependant cette molécule reste marginale dans les études en phase clinique.

Tableau 4 : Présentation des différentes molécules chimiques inhibant l'interaction gp120-CD4. D'après (Reeves and Derdeyn 2007).

Name	Structure	Target site	Mechanism	Development status	Source
BMS-378806		CD4 binding site on gp120	Blocks CD4-binding to gp120	Phase I discontinued	Bristol-Myers Squibb
BMS-488043		CD4 binding site on gp120	Blocks CD4-binding to gp120	Phase IIa supplanted by superior compounds	Bristol-Myers Squibb
NBD-556 (R = Cl) NBD-557 (R = Br)		gp120	Blocks CD4-gp120 interactions	Preclinical	New York Blood Center
WO 2005/016344 Example 12		Not specified, likely gp120	Blocks CD4-gp120 interactions	Preclinical	Pfizer
WO 2005/121094 Example 18		Not specified, likely gp120	Blocks CD4-gp120 interactions	Preclinical	Pfizer
WO2005/121175 Compound 5		CD4 mimetic binds to gp120	Induces conformational change in envelope to expose cryptic epitopes for antibodies	Preclinical	Chiron
Bivalent inhibitor		CD4 binding site on gp120	Not specified	Preclinical	Univ. of Maryland
Pro 542	sCD4-IgG2 Ab	CD4 binding site on gp120	Blocks CD4-gp120 interactions	Phase II	Progenics
sCD4-17b	D1D2 of sCD4 linked to 17b monoclonal Ab	CD4 and coreceptor binding sites on gp120	Blocks CD4 and coreceptor interactions with gp120	Preclinical	NIH
CD4 M33	27 amino acid CD4 mimic	CD4 binding site on gp120	Blocks CD4-gp120 interactions	Preclinical	CEA Saclay
IgG1b12	mAb against gp120	CD4 binding site on gp120	Blocks CD4-gp120 interactions	Preclinical	Scripps Research Institute
CADA		CD4 related pathways	CD4 down modulation	Preclinical	Rega Institute
NSC-13778		D1/D2 of CD4	Block at least part of the gp120-binding site on CD4	Preclinical	NCI
TNX-355	Humanized mAb against CD4	D2 of CD4	Prevent CD4-induced conformational changes in gp120	Phase II	Tanox

Tableau 5 : Présentation des différentes molécules chimiques inhibant l'interaction gp120-corécepteurs. D'après (Reeves and Derdeyn 2007).

Compound	Manufacturer	Identity	Target	Phase
Met-RANTES	N/A	N-terminal methionine added	CCR5	Preclinical
RANTES (9-68)	N/A	Truncated RANTES	CCR5	Preclinical
RANTES (3-68)	N/A	CD26-processed RANTES	CCR5	Preclinical
AOP-RANTES	N/A	Aminoxyptentane-RANTES	CCR5	Preclinical
NNY-RANTES	N/A	N-nonanoyl-RANTES	CCR5	Preclinical
PSC-RANTES	N/A	N-nonanoyl, thioproline, cyclohexylglycine-RANTES	CCR5	Preclinical
LD78β	N/A	Isoform of MIP-1α	CCR5	Preclinical
Met-SDF1	N/A	N-terminal methionine added	CXCR4	Preclinical
P1/P2-RANTES	N/A	Phage display selection of mutant library	CCR5	Preclinical
RCP189	N/A	Modified chemokine	CCR5	Preclinical
RCP169	N/A	Modified chemokine	CXCR4	Preclinical
ALX40-4C	N/A	9 D-amino acid peptide	CXCR4	I
T22	N/A	18 amino acid peptide	CXCR4	Preclinical
T140	N/A	14 amino acid peptide	CXCR4	Preclinical
CCL5 + FvCD4	N/A	Fusion protein of RANTES-anti-CD4	CCR5 + CD4	Preclinical
PRO-140	Progenics	Monoclonal antibody	CCR5	I
CCR5mAb004	Human Genome Sciences	Monoclonal antibody	CCR5	I
AMD3100	AnorMed	Bicyclam	CXCR4	Discontinued
AMD3465	AnorMed	Monomacrocyclic	CXCR4	Preclinical
AMD3451	AnorMed	N-pyridinylmethyl cyclam	CCR5 & CXCR4	Preclinical
AMD887	AnorMed	Small molecule	CCR5	Preclinical
AMD070	AnorMed	Small molecule	CXCR4	I/II
"9 g"	AstraZeneca	Phenylacetamide	CCR5	Preclinical
GW873140 (Aplaviroc)	Glaxo SmithKline	Spirodiketopiperazine-derivative	CCR5	Discontinued
KRH-2731	Kureha	Arginine derivative	CXCR4	Preclinical
KRH-3955	Kureha		CXCR4	Preclinical
KRH-3140	Kureha		CXCR4	Preclinical
UK-427,857 (Maraviroc)	Pfizer	Benzimidazole, 4,4-fluorocyclohexanecarboxamide	CCR5	II/III
Sch-C	Schering-Plough	Oximino-piperdicino-piperidine amide	CCR5	Discontinued
Sch-D (Vicriviroc)	Schering-Plough	Piperazino-piperidine	CCR5	II
INCB9471	Incyte		CCR5	Preclinical
Cmpd 167	Merck		CCR5	Preclinical
TAK-779	Takeda	Quaternary ammonium anilide	CCR5	Discontinued
TAK-220	Takeda	Piperidine-4-carboxamide	CCR5	Preclinical
TAK-652	Takeda	Carboxamide monomethanesulfonate	CCR5	Preclinical

III - Inhibiteurs peptidiques

A - Peptides dérivés du CD4

Des peptides mimant certaines régions du CD4 ont été également mis au point. Il s'agit notamment du CD4M9 obtenu en remplaçant une boucle de la charybdotoxine du scorpion par un analogue de la boucle du domaine CDR2 du CD4 qui se lie à la gp120. Ce peptide va agir par antagonisme avec le CD4 en se fixant sur la gp120 (Vita, Drakopoulou et al. 1999). Ce peptide a été optimisé pour obtenir un fragment de 27 acides aminés appelé CD4M33 agissant à des concentrations de l'ordre du μM et efficace sur les isolats primaires (Martin, Stricher et al. 2003). Afin de bloquer plus efficacement les trimères de gp120, des molécules bivalentes, contenant deux fragments M9 liés entre eux par un linker ont été développées augmentant ainsi l'activité de ces peptides de 5 à 20 fois (Li, Song et al. 2004).

B - Peptides dérivés des chimiokines

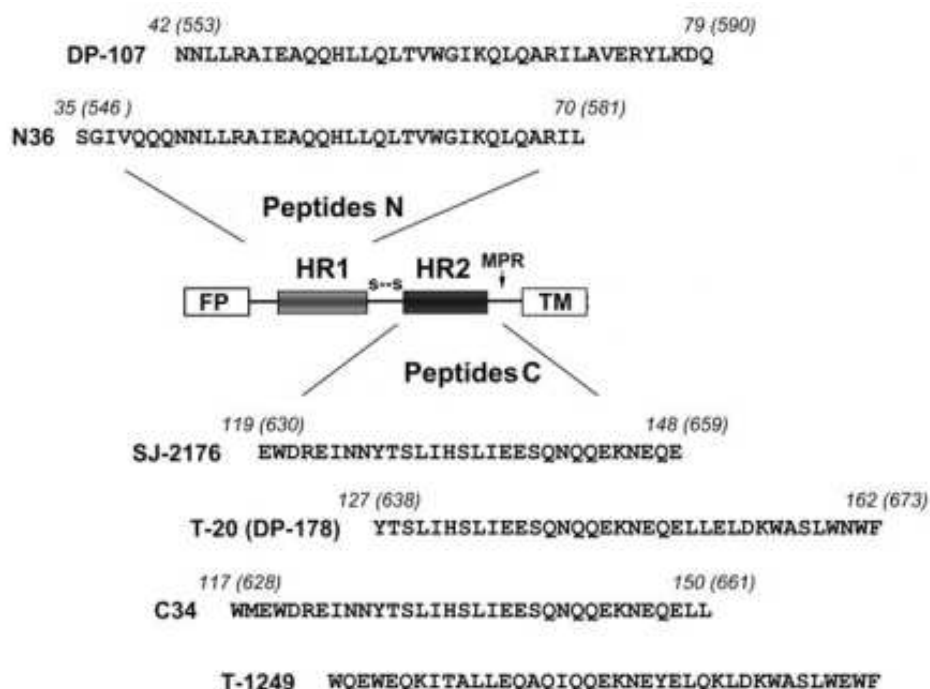
La modification des ligands naturels des co-récepteurs, les chimiokines, est une piste privilégiée dans la recherche d'inhibiteurs anti-VIH. C'est le cas notamment de la chimiokine RANTES, ligand de CCR5. La modification de la partie N-terminale de RANTES par l'AOP (aminooxypentane) (Proudfoot, Buser et al. 1999) a permis d'obtenir l'AOP-RANTES ainsi que des analogues comme le NNY-RANTES ou le PSC-RANTES. Ces analogues sont biologiquement inactifs mais ils gardent leur activité antivirale à des concentrations de l'ordre du pM. Ces modifications permettent de conserver une meilleure affinité pour le CCR5 et augmentent l'induction de l'internalisation de ces co-récepteurs. De plus, elles inhibent le chimiotactisme des cellules traitées. Le même effet est obtenu si on traite MIP-1 α ou LD78 β avec l'AOP. D'autres modifications consistent à déléter une dizaine d'acides aminés en N-terminal permettant d'obtenir des analogues de RANTES appelés MCP1-RANTES (Gong, Ugucioni et al. 1996). Met-RANTES est obtenu par extension de la partie N-terminale en conservant la méthionine introduite lors de la traduction de la protéine (Proudfoot, Power et al. 1996). Cette modification inhibe complètement la mobilisation du calcium et le chimiotactisme normalement induits par RANTES.

L'ALX40-4C est un petit peptide antagoniste du CXCR4 qui se fixe à son domaine ECL2 (Doranz, Filion et al. 2001). Testé en phase clinique I, il s'est avéré incapable de bloquer la réplication de virus R5(X4) tropique (Doranz, Filion et al. 2001). Un autre peptide de 18 acides aminés appelé T22 et son dérivé le T140 (14 aa) se fixe au CXCR4 et inhibe la fixation de SDF1- α ainsi que la réplication virale (Tamamura, Xu et al. 1998). Il est intéressant de noter que le T140 a également des propriétés anticancéreuses, particulièrement en inhibant le processus métastatique (Tamamura and Fujii 2005). Il est efficace dans le traitement contre le cancer du sein (Tamamura, Hori et al. 2003), du pancréas et sur le mélanome. Rappelons que parmi les 500 médicaments les plus utilisés, 30% ont pour cibles les récepteurs à 7 segments transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) incluant des anti-histaminiques, des anti-migraineux, des analgésiques, des β bloquants ou des anti-psychotiques.

C - Peptides dérivés de la gp41

Des peptides synthétiques dérivés du domaine HR2 ont prouvé leur capacité à inhiber la réplication du VIH-1 *in vitro* et *in vivo* (Wild, Oas et al. 1992; Jiang, Lin et al. 1993; Jiang, Lin et al. 1993; Wild, Shugars et al. 1994; Chan, Fass et al. 1997; Chan, Chutkowski et al. 1998).

Figure 19 : Présentation des séquences d'acides aminés de différents inhibiteurs agissant au niveau de la gp41. D'après (Reeves and Derdeyn).



Le peptide modèle de ces inhibiteurs est le peptide T20 initialement nommé DP178 (Wild, Shugars et al. 1994). Il est actuellement commercialisé sous le nom de fuzeon® ou enfuvirtide®. Le T20, peptide de 36 aa, correspond au domaine HR2 de la gp41 en grande partie, mais il est décalé d'une dizaine d'acides aminés vers la partie C-terminale, riche en tryptophanes. Il interagit en se fixant sur le domaine HRI mais dans une région différente de la cavité du HRI avec laquelle interagit le domaine HRII. Il était admis que le T20, comme les peptides C (SJ-2176, C34) bloquaient la formation du complexe 6HB entre HRI et HRII. Cependant, des études récentes ont montré que le T20 interagit aussi, par sa partie C-terminale avec la membrane ou avec une région de la gp41 proche de la membrane empêchant ainsi le recrutement à ce niveau-là d'autres complexes gp41-membrane nécessaire à la formation du pore de fusion (Kliger, Gallo et al. 2001). D'autres études ont montré que le T20 pouvait interagir également avec le domaine de la gp120 qui se fixe normalement au co-récepteur CXCR4 (Yuan, Craig et al. 2004).

Le peptide C34 correspondant aux résidus 628-661 de la gp41 (voir séquence sur la figure 19) a été mis en évidence par Chan (Chan, Chutkowski et al. 1998). Il correspond au domaine HRII de la gp41 et contient les 3 acides aminés, le tryptophane 628, le tryptophane 631 et l'isoleucine 635, qui sont essentiels pour l'interaction avec le domaine HRI. Ce peptide mime parfaitement le domaine C de la gp41 et peut également adopter une structure en hélice α en présence du domaine N. *In vitro*, en présence du virus et de ses cellules cibles, ce peptide va agir comme antagoniste du domaine HR2 naturel du VIH en venant se fixer sur le domaine HRI de la gp41, bloquant ainsi la formation du complexe 6HB avec le HR2 natif et donc le processus de fusion. Le C34 possède une activité inhibitrice supérieure d'un facteur 10 au T20, avec une IC50 de l'ordre du nM. Cette meilleure activité s'explique par la présence des résidus tryptophanes 628, 631 et isoleucine 635 qui en se fixant dans la cavité hydrophobe spécifique du N36 assurent une grande stabilité au complexe N-C (Chan, Chutkowski et al. 1998). Cette cavité étant très conservée chez les différents isolats de VIH, le peptide C34 est, par conséquent, efficace sur un large spectre de virus.

L'utilisation d'analogues du peptide C34 contenant le domaine d'interaction avec la poche hydrophobe de HRI se trouve limitée par leur faible solubilité par rapport au T20. Plusieurs analogues ont été développés et testés en phase clinique. C'est le cas notamment du peptide T-649 qui correspond à la séquence du C34 avec deux acides aminés supplémentaires (2 thréonines) en C-terminal. Tout comme le C34, il interagit avec HRI au niveau de la poche

hydrophobe et bloque ainsi la formation du complexe. Ce peptide s'est révélé plus efficace que le T20 sur un panel de 55 isolats primaires de VIH-1 (Derdeyn, Decker et al. 2001). De plus, en présence de ce peptide, l'apparition d'isolats de virus résistants est beaucoup plus retardée qu'avec le T20 (Armand-Ugon, Gutierrez et al. 2003). Les propriétés antivirales plus efficaces du T-649 sont en rapport avec sa capacité d'établir des liaisons plus stables avec la poche hydrophobe de HRI (Chan, Chutkowski et al. 1998).

Le T-1249 est un autre peptide de 39 acides aminés qui combine à la fois la partie C-terminale du C34 qui contient le domaine de fixation à la poche hydrophobe de HR1 et la partie N-terminale du T-20 qui contient la séquence ELDKWA. De plus, la séquence de T-1249 dérive d'une combinaison entre des séquences du VIH-1, du VIH-2 et du VIS (Lalezari, Bellos et al. 2005). Ce peptide présente des activités antivirales intéressantes par rapport aux peptides T20 et T-649. En effet, il présente une activité antivirale même contre les isolats de virus résistants au T20 (Menzo, Castagna et al. 2004; Reeves, Lee et al. 2005).

Cependant, l'utilisation de ces peptides chez l'homme reste difficile à cause des limitations liées à leur biodisponibilité.

D'autres approches ont été développées dans le but d'augmenter la solubilité et la stabilité de la conformation en hélice α de ces peptides. L'introduction d'acides aminés chargés, glutamate ou lysine, en position i et $i+4$ (Figure 14) de l'hélice, principalement au niveau des aa non conservés en position (b), (c), (f) et (g) permet d'augmenter la solubilité et l'induction de ponts salins qui contribuent à la stabilité de la structure de l'hélice. L'activité antivirale de ces peptides s'est révélée très prometteuse (Otaka, Nakamura et al. 2002). Notons que dans cette stratégie les résidus essentiels (W628, W631 et I635) en position (a) et (d) de l'hélice n'ont pas été modifiés.

En résumé, l'objectif final de ces modifications est d'arriver à développer des peptides :

- i) de petite taille, environ 10 aa, compatibles avec une administration orale,
- ii) possédant une forte activité antivirale,
- iii) avec une forte stabilité *in vivo*, lui conférant une plus grande demi-vie et lui permettant ainsi d'exercer son activité antivirale le plus longtemps possible.

En effet, les limitations de l'utilisation du T20 sont de 3 ordres :

- Un mode d'administration par injection contraignant.
- Une faible demi-vie qui impose deux injections de 90 mg par jour. Ces injections répétées sont accompagnées, chez certains patients, d'effets secondaires indésirables comme l'apparition de nodules au niveau des sites d'injection (Myers, Selim et al. 2006).
- L'émergence de virus résistants au peptide T20.

De plus le traitement par le T20 revient à un coût qui reste élevé, estimé à 2700 €/mois pris en charge à 100% par la sécurité sociale en France.

*Tableau 6 : Présentation des différentes molécules actuellement en développement.
D'après (Reeves and Derdeyn 2007).*

Inhibiteurs	Type	Cible principale	IC50
T-20/Enfuvirtide ^R (DP-178)	C peptide	HR1	nM
T-649 (C34)	C peptide	HR1	nM
T-1249	C peptide	HR1	nM
D10-p5-2K, D10-p3-2K	Version D du peptide C	Poche HR1	μM
C14linkmid	C peptide	HR1	μM
HIV31	C peptide	HR1	nM
N34(L6)C28	Protein recombinante	HR1 (?)	nM
ADS-J1, ADS-J2	Petite molécule	Poche HR1	μM
XTT formazan	Petite molécule	Poche HR1	μM
T-21 (DP-107)	N peptide	HR2, HR1	nM- μM
N36	N peptide	HR2, HR1	nM- μM
IZN36	N peptide	HR2	nM
5-Helix	Protein recombinante	HR2	nM
N _{CCG} -gp41	Protein recombinante	HR2	nM
N36 ^{mut(e.g)}	N peptide	HR1	>μM

Chapitre IV

Objectifs

Le processus de fusion est une des premières étapes du cycle de réplication du VIH-1. C'est une étape essentielle pour l'entrée du virus et donc l'infection de la cellule hôte.

La description de la structure de la gp41, et particulièrement du complexe trimérique organisé en hélice α des domaines HRI (N36) et HRII (C34) (Chan, Fass et al. 1997), a permis de mieux appréhender ce processus et de modéliser des peptides capables d'inhiber cette étape. Le DP178 ou T-20, plus connu sous sa forme commerciale Enfuvirtide®, fait partie de la classe des peptides mimant le domaine HRII. Son interaction avec le domaine HRI et la membrane de la cellule cible permet d'inhiber le processus de fusion. Ce peptide possède une bonne activité antivirale avec une IC50 de l'ordre du nM ; cependant son utilisation se heurte à une difficulté majeure. En effet, ce peptide possède une demie-vie relativement courte dans le plasma à cause d'une élimination rapide par les protéases présentes dans les liquides physiologiques. Pour être efficace, le peptide doit être administré aux patients à raison d'une injection de 90 mg de T-20 deux fois par jour, ce qui occasionne des effets secondaires comme l'apparition de nodules au niveau des sites d'injection (Ball and Kinchelow 2003). De plus, de nombreux isolats de virus résistant au T-20 ont fait leur apparition ce qui limite son efficacité.

Le peptide C34, qui représente le domaine HRII de la gp41 partage une vingtaine d'acides aminés avec le T-20. En fait, le T-20 est décalé de 10 acides aminés vers la région C terminale. Il possède une meilleure activité antivirale que le T-20, avec une IC50 approchant 1 nM (contre 10-20 nM pour le T-20). Son utilisation thérapeutique fut freinée par une solubilité inférieure à celle du T-20 en raison de la présence de résidus hydrophobes plus nombreux. Il est également soumis aux mêmes contraintes que le T-20 en ce qui concerne sa sensibilité aux protéases.

Le but de ce travail est d'optimiser ce peptide C34 en le rendant, d'une part, plus résistant à la dégradation protéasique et d'autre part en lui conférant une meilleure solubilité. Afin d'augmenter cette résistance, nous avons remplacé certains acides aminés par leur homologue de configuration D. En effet, contrairement aux acides aminés de série L, les liaisons peptidiques des acides aminés de série D ne sont pas sensibles à l'action des protéases. Afin de préserver l'interaction du C34 avec la poche hydrophobe du N36, les acides aminés intervenant dans cette interaction n'ont pas été modifiés. D'autres acides aminés ont été modifiés afin de tenir compte de l'impact de l'introduction d'acides aminés de

type D sur la structure de l'hélice α . En effet, ces résidus possédant une orientation inversée, la structure de l'hélice α risque de se trouver altérée.

Dans une deuxième partie de notre travail, nous nous sommes intéressées à l'immunogénicité de la région HRII de la gp41 du VIH-1.

En effet, le peptide T-20, en plus de son activité antivirale, est aussi immunogène ce qui induit la production d'anticorps anti-T-20. La question abordée ici est d'évaluer l'effet de ces anticorps sur l'activité antivirale du T-20. Dans ce but, des anticorps anti-peptides HRII ont été produits chez la souris et testés pour leur activité neutralisante (afin de déterminer si ces peptides peuvent être utilisés comme antigène vaccinal) et leur capacité à interférer avec l'activité antivirale des peptides.

En parallèle, nous nous sommes intéressés au rôle de la région V3 dans l'induction d'anticorps neutralisants. En effet, la boucle V3 du VIH possède deux propriétés très importantes. D'une part elle joue un rôle déterminant dans le processus d'attachement du virus, notamment dans l'interaction du complexe gp120-gp41/CD4 avec les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 et, d'autre part, elle présente un domaine très conservé et fortement immunogène capable d'induire la production d'anticorps monoclonaux neutralisants. Ces anticorps, *in vitro*, inhibent la réplication du virus. En revanche, *in vivo*, la mise au point d'antigènes capables d'induire une telle réponse s'avère difficile. Le VIS, qui présente une grande homologie avec le VIH, aussi bien sur les plans structural et fonctionnel que sur sa capacité à induire une immunodéficience chez le sujet infecté, constitue un modèle d'étude pour la mise au point de vaccins candidats. Dans ce travail, nous étudierons le rôle de la conformation de la boucle V3 sur l'induction de la production d'anticorps neutralisants en utilisant des peptides linéaires ou cyclisés pour mimer la conformation de la boucle V3.

Dans la dernière partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'interaction virus-cellule sur l'activation de la voie PKC. Le rôle de l'activation de cette voie sur la réplication virale a été évalué en utilisant des approches permettant son inhibition.

Chapitre IV
Partie expérimentale

Article 1

manuscript

Development and characterization of peptidic fusion inhibitors derived from HIV-1 gp41 with partial D-amino acid substitutions

GASTON Fabrice*•, GRANADOS Giovana †•, MADURGA Sergio†‡, RABANAL Francesc LAKHDAR-GHAZAL Faouzi*, GIRALT Ernest §†, and BAHRAOUI Elmostafa*

Accepté par ChemMedchem

Résumé de l'article

Le but de cette étude a consisté à modéliser des peptides synthétiques, composés d'acides aminés de type D, mimant la région HR_{II} de la gp41 du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Pour cela, de nouveaux analogues du C34L présentant une activité antivirale ont été développés en introduisant ponctuellement des acides aminés de type D sans modifier les acides aminés essentiels du domaine HR_{II} interagissant avec HRI. Les résultats rapportés ici concernent des analogues du peptide C34L dont son énantiomère C34D, son analogue rétro-inverso (RI) ainsi que deux peptides présentant des mutations ponctuelles avec des acides aminés de série D, C34M2 et C34M3. Nos résultats montrent que ces peptides, excepté le peptide RI, adoptent une structure en hélice α et sont capables d'interagir avec le domaine HRI de la gp41. De plus, nous montrons que les modifications introduites dans le peptide C34M2, mais pas celles introduites dans le peptide C34M3, augmentent sa résistance à la dégradation par la trypsine et sa stabilité dans le sérum. Il est à noter que ces modifications n'ont pas altéré l'activité antivirale de ces peptides : l'activité reste comparable à celle du peptide natif. Ces résultats montrent l'importance et l'intérêt que représentent les acides aminés de type D dans la composition de peptides inhibiteurs et ouvrent la voie vers la conception de nouvelles molécules beaucoup plus stables et gardant une activité antivirale efficace. En effet, l'une des grandes limitations dans l'utilisation de peptides analogues de ce domaine, comme le Fuzeon® par exemple, réside dans la double injection quotidienne de 90 mg de ce peptide, ce qui constitue une contrainte non négligeable pour les patients.

Development and characterization of peptidic fusion inhibitors derived from HIV1gp41 with partial D-amino acids substitutions

GASTON F.^[a]•, GRANADOS G.^[b]•, MADURGA S.^{[b][c]}, RABANAL F. LAKHDAR-GHAZAL F.^[a], GIRALT E.^{[b][d]}, and BAHRAOUI E.^[a]*

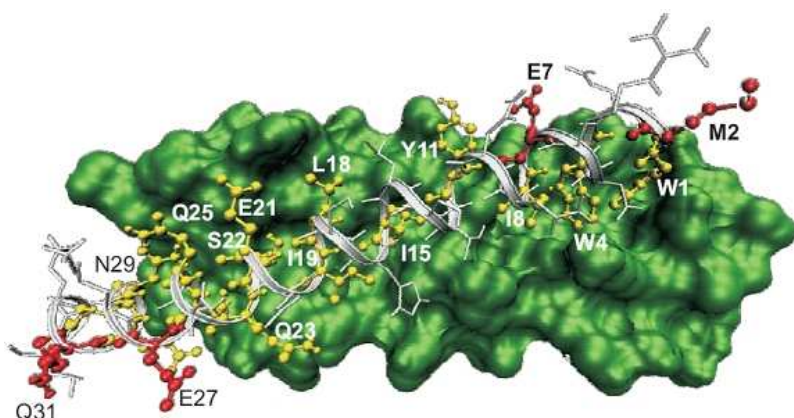
^[a]Laboratoire d'immuno-virologie, Université Paul Sabatier, UFR/SVT, 31062 Toulouse, France, ^[b]Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona, Parc Científic de Barcelona C/Josep Samitier 1-5 08028 Barcelona, Spain, ^[c] Departament de Química Física de la Universitat de Barcelona-IQTUB, 08028, Barcelona, Spain. ^[d] Departament de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona, 08028, Barcelona, Spain.

•These two authors contributed to the paper in equal parts.

*Corresponding author; email:bahraoui@cict.fr

Keywords: C34, D-amino acids, HIV-1, inhibitors, peptides

Text for table of content:



Interactions between C34 and N36 :
Representation of helix C34L (grey ribbons) and two interacting N36 peptides (green surface). The yellow residues label the positions directly involved in the interaction with N36. The red residues show the positions which were substituted in the C34L analogues.

Abstract

The aim of this study was to design synthetic peptides with D-amino-acid substitutions that mimicked the Human Immunodeficiency Virus (HIV) gp41 HR2 region. The objective was to develop new and active C34 analogue peptides by introducing punctual D-amino acid substitutions at the non-essential sites for HR1-HR2 interaction without disrupting the structure of the peptide. Here, we report a study with C34L peptide analogues including its enantiomer C34D peptide, the retro-inverso analogue (RI), and two peptides with punctual D-amino acid substitutions (C34M2 and C34M3). Our results show that these peptides, except the RI, adopt an α -helical structure and are, like C34L, able to interact with HR1 mimicked by N36 peptide. Furthermore, we show that modifications introduced in C34M2, but not in C34M3, enhance its resistance to enzymatic hydrolysis by trypsin treatment and increase C34M2 stability in physiological medium. Interestingly, our results show that C34 peptide analogues, C34M2 and C34M3 but not C34D and its RI analogue, retain their ability to inhibit HIV-1 replication with an efficiency similar to that of C34L peptide. These data underline the interest of using D-amino acids at specific sites in the C34 peptide sequence and may lead to a new strategy for the development of more stable and active anti HIV-1 peptidic drugs.

Introduction

HIV preferentially infects CD4 cells, including T4 lymphocytes, monocytes/macrophages and dendritic cells.^[1, 2] This tropism is determined by the viral envelope glycoproteins, the cellular CD4 receptor and CCR5 or CXCR4 coreceptors.^[3] Envelope glycoproteins are synthesized as a 160 kDa precursor that is cleaved at the trans-Golgi level by cellular endoproteases, yielding mature external envelope gp120, also named surface unit (SU) and transmembrane (TM) gp41 glycoprotein.^[4] Both proteins interact together by non-covalent interactions to form trimers on the surface of viral particles and infected cells.^[5] The high affinity interaction between gp120 and CD4 (Kd =1nM) induces significant structural modifications leading to the formation and exposition of a new domain of gp120 that undergoes a second interaction with the chemokine receptors CCR5 or CXCR4.^[3, 6] Upon gp120 receptor and coreceptor binding, subsequent rearrangements within the TM gp41 lead to the exposition of a previously hidden hydrophobic *N*-terminal region, named fusion peptide. Then, the insertion of this hydrophobic *N*-terminal fusion domain into the

membrane of the host cell can initiate viral and host cell membrane fusion.^[7] This insertion is accompanied by structural modifications of the heptad repeat regions HR1 and HR2, which fold into hairpin-like structures where the two hydrophobic helices HR1 and HR2 lie in an antiparallel orientation to form a six helix bundle (6HB). The latter structure can then promote fusion by bringing viral and cellular membrane into close proximity.^[8]

Three essential domains have been determined in the gp41 ectodomain. The *N*-terminal fusion peptide (FP) (residues 512 to 527) is characterized by its hydrophobicity. The HR1, a structured helical coiled-coil, also named *N*-HR (residues 542 to 592) is followed by the HR2 also called *C*-HR (residues 623 to 663) which is also structured in helical coiled-coil domain. This domain is of a great importance in the development of anti-HIV vaccines as broadly neutralizing antibodies recognize an epitope in this region.^[9] Despite the high variability of the HIV-1 genome, the HR1 and HR2 domains are conserved.^[10] The relatively high conservation of HR1 (around 65% in M group), in comparison with HR2 (34% in M group),^[11] may be correlated with the localization of the RRE (Rev Responsive Element) within this region. This region is essential for the export of mono- and unspliced viral mRNA from the nucleus to the cytoplasm.^[12]

The fusion process is a complex phenomenon that depends on a wide range of structural, biochemical and biophysical interactions. In addition, the molecular and structural mechanisms of membrane fusion, mediated by HIV-1 gp41, are still only partially understood, but enough to allow the development of new molecules able to block this key step of the viral cycle. To this end, the first applications showed that the (FP) of HIV-1, and its analogues^[13, 14] were able to inhibit HIV-1 envelope glycoprotein mediated fusion. So far, efforts have been focused on developing fusion inhibitor peptides that interfere with HR1 and HR2 interactions. The T20 (DP-178 or enfuvirtide/fuzeon®) is a 36-amino-acid peptide sharing two-thirds of its *N*-terminal amino acids with HR2.^[15] This peptide efficiently inhibits HIV-1 replication *in vitro* at nM levels,^[16, 17] and *in vivo*.^[18] Its inhibitory activity seems to be mediated by direct interactions with HR1 and by interaction of its *C*-terminal part, different from HR2, with membrane or the transmembrane domain of gp41.^[19-23] T20 is now currently used as an entry inhibitor of HIV, essentially in patients who have developed resistance to the usual highly active antiretroviral therapy (HAART).^[24] However, the growing problem of the emergence of new T20 resistance to HIV-1 strains^[25] needs the development of new peptidic inhibitors including: i) analogues of T20 such as T-1249,^[26] a 39 all *L*-amino acid peptide composed of sequences derived from HIV-1, HIV-2 and SIV. The great advantage of this peptide is its ability to remain active against T20-resistant viruses,^[27] ii) C34 peptide, corresponding to

HR2, which inhibits HIV-1 infection in vitro at nM level. Several analogues of HR2 regions have also proved to be potent inhibitors both in vitro and in vivo,^[26, 28, 29] iii) N36 peptide, a 36 amino acid peptide corresponding to HR1. In contrast to T20 and C34 peptides, N36 peptide inhibits HIV-1 with lower activity (IC₅₀ of the order of a μM).^[30] The use of T20 peptide is also limited essentially by its relatively short half-life in vivo.

The introduction of D-amino acids in punctual positions may enhance the resistance of peptides or proteins to protease degradation. However, the structural stability, conformation and activity might be negatively affected.^[31] The magnitude of the structural changes depends on the localization and the character of the modification.^[32] Partial D-amino acid substitutions could break the structure, decreasing its stability, or, in contrast, restrain a favourable conformation with lower stability cost. For instance, the substitution of glycine residues by D-alanine satisfies the topological requirements for retaining structure and function^[33] or even increasing stability.^[34, 35] This suggests the possibility of substituting L by D-amino acid without producing large perturbations in the structure and, in consequence, in the activity of peptides or proteins.

The objective of this study was to initiate the development of new and active C34 analogue peptides by introducing punctual D-amino acid substitutions at the potentially more sensitive enzymatic cleavage sites without disrupting the structure of the peptide.

Here, we report a study with C34L peptide analogues including its enantiomer C34D peptide, the retro-inverso analogue (RI), and two peptides with punctual D-amino acid substitutions (C34M2 and C34M3). Our results show that these peptides, except the RI, adopt an α -helical structure and are, like C34L, able to interact with HR1 mimicked by N36 peptide. Furthermore, we show that modifications introduced in C34M2, but not in C34M3, enhance its resistance to enzymatic hydrolysis by trypsin treatment and increase C34M2 stability in physiological medium. Interestingly, our results show that C34 peptide analogues C34M2 and C34M3 but not C34D and its RI analogue, retain their ability to inhibit HIV-1 replication with efficiency similar to that of C34L peptide.

Results

Design of C34 peptide analogues

Several aspects were taken into account to rationalize the design of C34L analogues. First, because the use of D-amino acids could destabilize the C34 helical tendency, an

approach using only limited residue substitution was chosen. Second, C34 mutated residues were selected as not being important in the C34-N36 trimer interaction. Third, mutated residues were selected in pairs that were separated by one turn of the C34 helix in order to promote the establishment of non-covalent bonds in the direction of the helix macrodipole

Calculations of the docking of C34L peptide to the three-N36-helix core were performed to determine the most important residues in the C34-N36 interaction. Only one cluster of docked structures with an RMSD of 0.4 Å with respect to the crystallographic C34 binding mode was obtained, which indicated that enough energy evaluations had been performed to obtain converged results. The contribution of each C34L residue to the docking energy is shown in Fig 1. It can be seen that only a subset of residues makes an important contribution to the stabilization of the C34 peptide with the core of N36 trimer. The two major contributions correspond to the Trp628 and Trp631 residues, which are in a hydrophobic cavity formed inside the N36 core.^[41] These two residues are in the *N*-terminal part of C34L and are separated by one turn. In the next three turns of the C34L helix, Ile635, Tyr638 and Ile642 are in contact with the N36 trimer, making an important contribution to the docking energy. However, for the last half of C34 peptide, a different pattern of intermolecular interactions can be observed. At each turn, in general, the interaction involves more than one residue: Leu645 and Ile646 for the sixth turn, Glu648, Ser649 and Gln650 for the seventh turn, Gln652 and Gln653 for the eighth turn, Asn656 and Glu657 for the ninth turn, and finally, Leu660 for the last turn.

Accordingly, two C34L peptide analogues, named C34M2 and C34M3, with different selected mutations were designed. For the first analogue (C34M2), two slightly interacting residues separated by one turn were selected in the *N*-terminal region (Glu654 and Gln658). The two C34 sequence changes were E654e and Q658k. We replaced the Glu654 by its *D*-amino acid enantiomer in order to enhance the resistance of the cleavage site at Lys655. However, to conserve an ionic bond with its γ COOH function, the *L*-Gln residue at position 658 was substituted by a *D*-Lys. In consequence, the resulting ionic interaction was present at the opposite face of the helix and helped to stabilize the α -helical structure of the peptide. For the second analogue (C34M3), in addition to the modifications introduced in C34M2 peptide, two new modifications were added. At position 629, the *L*-Met was replaced by a *D*-Glu amino acid and at position 634, the *L*-Glu was substituted by an *L*-Lys. The goal of the first modification was to introduce a dipeptidyl protease resistant site and the aim of the second was to introduce a negatively charged amino acid able to establish a salt bridge with the Lys 634 in the direction of the macrodipole. This modification attenuated the impact of *D*-amino

acid introduction at position 629. The docked structure of the C34 peptide complexed with the core of three N36 peptides is shown in Fig 1a. It can be seen that residues Met629(M2 in the figure), Glu634(E7), Glu654(E27) and Gln658(Q31) of C34L which were changed in C34M2 or C34M3 heteroquiral analogues did not directly interact with the N36 trimer. Thus, the mutation of these residues did not disturb the C34-N36 complex formation to any great extent according to molecular dynamic calculations (**see supporting information**).

Physicochemical characterizations of C34L peptide and its analogues

The peptides were synthesized using a solid phase method with Fmoc strategy. All the peptides were purified by HPLC chromatography and had at least 95% purity (**supporting information**). In addition to C34M2 and C34M3, native C34L, C34D (all assembled D-amino acid peptides), RIC34 (the retro-inverso analogue), C34M1 (a scrambled amino acid C34L sequence peptide) and N36 peptides were also synthesized and used in order to compare the different interactions and activities. All peptides tested were acetylated and amidated at their N and C termini respectively (table 1).

Table 1: Amino-acid sequences of synthesized peptides

Peptide	Sequence ^[a]	Synthesis yield
C34L	⁶²⁸ WMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELL ⁶⁶¹	17%
C34M2	⁶²⁸ WMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQeKNEkELL ⁶⁶¹	26%
C34M3	⁶²⁸ WeEWD RKINNYTSLIHSLEESQNQQeKNEkELL ⁶⁶¹	34%
RIC34	⁶²⁸ lleqenkeqqnqseeilshilstynnierdwemw ⁶⁶¹	N.D.
C34D	⁶²⁸ wmewdreinnytslihsleesqnqqekneqell ⁶⁶¹	17%
C34M1	⁶²⁸ wedmwrnnvteylssilehveqqsnkqeeqenll ⁶⁶¹	N.D.
N36	⁵⁴⁶ SGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL ⁵⁸¹	24%

[a] Upper case: L amino acid Lower case: D amino acid

The homogeneity of the peptides was confirmed by amino acid composition analysis and molecular weight determination by MALDI-TOF.

The solubility of each peptide was calculated by mass spectrometry as described in the Material and methods section. The concentrations of the peptides were: 11.3 μ M for C34L, 70 μ M for C34M2 and 131 μ M for C34M3.

At a structural level, CD spectra of C34L, C34M2 and C34M3 alone in aqueous solution showed only a moderate α -helical structure. In contrast, when the analyses were performed in 30% of trifluoroethanol (TFE), the CD spectra clearly showed a double

minimum at 208 nm and 222 nm, characteristic of the presence of an α -helical structure (figure: 2a, 2b and 2c). Interestingly, when the analysis was performed in the same conditions with the all D-amino acids assembled C34D, a spectrum symmetrical to that of C34L was obtained (figure 2a). This effect is related to the dextrorotatory D-amino-acids of C34D peptide analogue.

CD spectral analysis was further used to study the capacity of C34 analogues to interact and to form a 6HB (trimer of hairpins)^[8, 36] with N36 peptide. For that purpose, CD spectra were obtained with equimolecular mixtures of N36 and C34 peptide analogues in aqueous solutions. The corresponding CD spectra of these mixtures, depicted in figure 2, clearly showed the capacity of C34L peptide and its analogues, C34M2 and C34M3, to interact with N36 peptide and to form α -helical structures. The level of α helicity of these complexes, classified by decreasing level, was N36+C34 (fig 2d), N36+C34M3 (fig 2f) and N36+C34M2 (fig 2e). In contrast, no interaction was observed with the C34M1 peptide control (fig 2g), as shown by the absence of the characteristics of α -helix structures.

The stability of the N36 and C34 peptide interactions was further characterized by measuring the thermal denaturation values of the complexes formed between N36 and C34L, C34M2 or C34M3 peptides. The melting curves and the mid point of the thermal unfolding transition (T_m) values were determined for each C34L peptide analogue (fig 3). The complex between N36 and C34L peptide showed a T_m value of 62.7°C, while those formed with C34M2 and C34M3 exhibited a similar T_m of 52.5°C. These data showed that, despite the introduction of 2 or 3 D-amino acids in C34M2 or C34M3 peptides respectively, these peptides showed higher solubility than C34L and conserved their capacity to interact and to form stable complexes with N36 peptide.

Susceptibility of C34 peptide analogues to trypsin cleavage

The trypsin treatment of C34L peptide led to the apparition of fragments resulted from the digestion at lysine or arginine amino acids. The MALDI-TOF analysis allowed us to identify the peptide fragments which corresponded to the hydrolysis of the Arg633-Glu634 and the Lys655-Asn656 (fig 4a-b). These products were in agreement with the peptides expected to result from a cleavage at basic amino acids Lys or Arg. The same approach was applied to C34M2 peptide analogue. The analysis of the trypsin digestion products by MALDI-TOF allowed us to identify only two peptides, with the following sequences:

WMEWDR, EINNYTSLIHSLIHSLIEESQNQQeKNEkELL (fig 4c-d). The absence of products of the hydrolysis between Lys655-Asn656, previously identified in trypsin treated C34L peptide, can be easily explained by the introduction of a D-Glu near the potential cleavage site at Lys655. Treatment of C34M3 peptide analogue with trypsin in the same conditions showed a very rapid degradation of the peptide (fig 4e-f). The analysis of the corresponding sequences by MALDI-TOF allowed us to identify the degradation between Arg633-Lys634 and Lys634-Asn635 leading to the apparition of the following peptide fragments: WeEWDR, WeEWDRK, RKINNYTSLIHSLIEESQNQQeKNEkELL. This great sensitivity of C34M3 to trypsin digestion can be explained by the introduction of an additional trypsin cleavage site by substituting a L-Glu by a L-Lys at position 634. As expected, when the totally D-assembled C34D peptide was subjected to the same trypsin treatment, no cleavage products were observed even after 48h of treatment (fig 4g).

Considering that kinetics of hydrolysis are of the first order, the half-life of each peptide was determined by applying the formula $\text{Log } C = \text{Log } C_0 - k_e t$, where C_0 and C correspond to the peptide concentrations at $t=0$ min and at time t , respectively, and k_e corresponds to the experimental kinetics determined from the curves of degradation kinetics. The half-lives determined for C34L peptide and its analogues were in the following order: C34M2 $t_{1/2} = 133$ min, C34L $t_{1/2} = 78$ min and C34M3 less than 15 min (fig 5). These data clearly underline the positive or negative effect of these mutations introduced in C34M2 or C34M3 peptide respectively on their stability with respect to trypsin treatment.

Using the same approach, C34L peptide and its analogues were subjected to chymotrypsin digestion for 15, 30, 60 and 120 min before HPLC analysis. The results obtained showed relative sensitivity of C34 L, C34 M2 and C34 M3 to chymotrypsin digestion (fig 6). About 50% of peptides were cleaved in the following order: C34L=15 min, C34M2=35mn and C34M3=40 min. The great sensitivity of these peptides to chymotrypsin digestion is related to the high number (more than 12) of potential cleavage sites. Here again, no cleavage was observed in the totally assembled D amino acids peptide C34 D.

Anti-HIV activities of C34 peptide and its analogues

The antiviral activities of C34 peptide and its analogues were investigated in three complementary assays including inhibition of: i) cell-cell fusion, ii) single cycle viral replication and iii) quantitative viral replication. Before using peptides on cells, their eventual

intrinsic cytotoxicity was evaluated. When used until up to 10^{-5} M in culture with HeLa cell lines or primary cells, these peptides do not exhibit any observable cytotoxicity as evaluated by the blue trypan exclusion assay or by comparing the growth curves of cells in the presence or absence of various amounts (10^{-5} to 10^{-9} M) of peptides (data not shown).

i) Potency of C34L peptide and its analogues to inhibit cell-cell fusion. The capacity of C34L peptide and its analogues to block syncytium formation between HeLa cells expressing envelope glycoproteins from HIV-1 LAI (X4 tropic virus), or HIV-1 ADA (an R5 macrophage tropic virus) and HeLa cells expressing human CD4 receptor CXCR4 or CCR5 HIV-1 coreceptors was investigated in the presence of various amounts of each peptide. Results from these experiments depicted in fig 7a, 7b and table 2 show that C34L, C34M2, C34M3 peptides inhibited syncytium formation in a dose dependent manner. Great, nearly total, inhibition was observed at 10^{-7} M concentration with all the three peptides. The concentration able to inhibit syncytium formation by 50% (IC₅₀) was determined for each peptide and is presented in table 2. The IC₅₀ values showed that, despite the introduction of non-natural D-amino acid in some positions, the highly antiviral activities of the peptides was conserved, as shown by the nM range of IC₅₀ values (table 2). However, no antiviral activity was observed with the totally assembled C34 peptide or with the RI analogue (fig 7).

ii) Antiviral activities of C34 peptide and its analogues in a single viral infectivity assay. In this assay, C34 peptide and its analogues were tested at various concentrations for their capacity to inhibit the infection of HeLa-CD4-CCR5/CXCR4-LTR- β -gal cells with HIV-1 LAI or HIV-1 BaL during a period of 20 h, a time corresponding to a single viral cycle. In fact, this assay enabled the completion of the first steps of viral cycle to be monitored, including adsorption, penetration and early genome expression. The assay was based on the ability of the early produced Tat to transactivate the expression of *Lac-Z* gene under the control of HIV promoter. In agreement with the cell-cell fusion assay, an inhibition of cell entry was observed by C34L peptide and its C34M2 and C34M3 analogues while no inhibition was observed with the C34D or RI peptide (fig 8, table 2). Interestingly, C34L peptide and its analogues seemed to be more active against the macrophage tropic than the T tropic virus in this assay (fig 8).

iii) Antiviral activities of peptides in a quantitative assay. In this assay, in contrast to the two previous ones, primary PBL cells or macrophages were used as target cells and infected with a T tropic virus (HIV-1 VN44) or macrophage tropic virus (HIV-1 BaL) respectively. The virions produced were quantified in the cell supernatants after three days of infection. The results showed that C34L peptide and its analogues totally inhibited HIV-1

VN44 and HIV-1 BaL replication when used at 10^{-6} M and 10^{-7} M (Fig 9, table 2). The IC50 values presented in table 2 show that C34 peptide and its analogues exhibited similar potency to inhibit HIV-1 replication, in the nM range, with IC50 varying from 0.3 to 5.8 nM. No antiviral activity was observed with the totally D-amino-acid-assembled C34D and the RI analogues.

Overall, our data showed that the inhibitory activity of the C34 peptide was chirality dependent for the totally assembled C34D amino acids and chirality independent when only some D amino acids were introduced as shown with C34M2 and C34M3.

Table 2. Anti HIV-1 activities of C34L peptide and its analogues tested in HIV-1 replication and syncytium assays. IC50 corresponds to the value able to inhibit 50% of HIV-1 replication or syncytium formation

	Inhibition of HIV-1 replication at day 3 PI		Inhibition of syncytium formation		
	<i>IC</i> ₅₀ BaL /nM	<i>IC</i> ₅₀ VN44 /nM	<i>IC</i> ₅₀ LAi /nM	<i>IC</i> ₅₀ ADA /nM	Loss of activity / % after 48h of incubation in human serum
C34L	2.65	0.58	0.41	2	70
C34M2	2.53	0.31	0.15	0.3	38
C34M3	5.57	5.79	4	5.8	100
C34D	-	-	-	-	-

Comparison of the stability of C34 peptide and its analogues in human serum

In order to test the stability of the antiviral activity of C34L peptide and its analogues in human serum, peptides were previously incubated for different times in human serum before the percentage of conservation of their initial antiviral activities was tested. As a control, peptides or sera alone were tested in the same assay. Results showed that C34M2 peptide exhibited the highest stability when compared to C34L and C34M3 peptides. After 48 h of incubation, losses of 100%, 70% and 38% of antiviral activities were observed with peptides C34M3, C34L and C34M2 respectively (table 2). It is interesting to note that these results correlated with the protease resistance of these peptides.

Discussion

All HIV inhibitors, unfortunately, face the problem of emerging viral resistance. To bypass this problem, it will be important to develop fusion inhibitors that bind key regions in

the gp41 HR1 and HR2 domains in different ways to offset the potential for cross resistance among agents in the fusion inhibitor class. For example, biochemical studies of HR2 derived peptides have shown that the molecular mechanisms involved in the inhibition of HIV fusion by C34 and T20 are different despite the fact that both are efficient in the nanomolar range.^[42] As for C34 peptide, T20 antiviral effect is also mediated by its interaction with HR1 but at different sites from those engaged with C34. In fact, T20 overlaps with C34 only by its first N terminal 23 amino acid residues. Data deduced from X-ray diffraction of HR1-HR2 complexes showed implication of Trp628, Trp631 and Ile635 amino acid residues (absent in T20 sequence) in interaction with residues Val570, Lys574, Gln577, Leu568, Trp571, Gly572, Thr569, Ile573 and Leu576 of the conserved pocket of HR1.^[36] These interactions have been shown to be implicated in the stabilization of the 6HB.^[42] The most active analogues of C34 peptides, including T-1249 and T-649, contain these three essential amino acids. Interestingly, the high efficiency of T649, an analogue with a two-amino-acid extension at the C-terminal of C34, against a panel of HIV-1 T20 resistant primary isolates seems to be associated with the higher stability of the 6HB formed by this peptide.^[42] T-1249, an analogue of both T649 and T20, also showed an antiviral activity against T20 resistant primary isolates.^[43] However, the development of such peptides has remained limited by problems related to their solubility and formulation.^[27] Thus any approach able to lead to an enhancement of the correct folding, stability and solubility needs to be investigated.^[44-46]

For example, despite its high antiviral activity, the L-amino acid assembled peptide T20 (Enfuvirtide®, Fuzeon®) suffers from several limitations including delivery by injection, necessity to administer large quantities (90mg twice daily), emergence of resistant isolates and high cost of the treatment. These constraints explain why this peptide is used particularly for the treatment of patients who have developed viruses with resistance to reverse transcriptase and protease inhibitors. To circumvent some of these limitations, synthetic peptides with D-amino acids need to be developed further. The first study using this approach described a 16 mer peptide which had only modest antiviral activity (IC₅₀=10uM).^[47] But recently, a more interesting study has shown that dimers or trimers of a D-15 mer peptide, also screened by a mirror-image phage display approach, interact with high affinity with HR1 and are highly efficient at inhibiting HIV-1 replication (IC₅₀ = 250 pM).^[48] It is interesting to note that this peptide, except for the conservation of the WXWL consensus sequence, has no evident homology of sequence with C34L peptide. The concept of its design was based essentially on a peptidomimetic approach to screen molecules able to bind to the N-trimer pocket with high affinity and to inhibit HIV-1 penetration. Interestingly, the analysis of the

crystal structure of the potent D peptide inhibitor of HIV-1 complexed with HR1 domain, revealed several key interactions including DTyr7-Trp571, DLys2-Trp571 and DTyr7-Glu575, allowing its high anti-HIV potency to be understood.^[48]

While several limitations of L-peptides, including T20, are related to their protease sensitivity, D peptides have many theoretical advantages. In the present study, we have shown that, as expected, the C34D peptide shows great resistance to protease treatment. It remains uncleaved even after 48h of incubation with trypsin or chymotrypsin. However, despite the fact that it conserves the propensity to adopt an α -helical structure, this peptide can become antivirally inactive. This loss of antiviral activity also correlates with its incapacity to interact with N36 peptide when analyzed by CD (data not shown). At a structural level, this loss of antiviral activity may be explained by the fact that the highly conserved residues, mostly residing at the a, d, and e positions in the heptad structure, are further oriented towards the opposite face of the conserved hydrophobic pocket of HR1. In consequence, no contact between C34D and the pocket structure of HR1 can occur. To try to compensate for these structural disadvantages we synthesized the retro-inverso (RI) analogue of C34L. This type of modification is accomplished by simply reversing the peptide sequence direction and inverting the chirality of each amino acid. Several studies have reported that retro-inverso peptides are topologically correlated with the parent peptide since the resulting side chain disposition is similar to the parent peptide, but carbonyl and amine groups are interconverted from their positions. Unfortunately, this RI peptide does not retain antiviral activity. This absence of activity may be related to the importance of the helical structure. It has been reported that the folding of RI peptide may be hindered when the peptide contains helical segments.^[49] However, several studies have shown that, in some cases, RI peptides can retain their biological activity with increased stability as reported for enkephalin, glutathione, substance P, gastrin and atrial natriuretic peptide.^[50]

As an alternative, we modified our strategy in order to be able to follow the antiviral activity of our designed peptide inhibitor step by step. We synthesized diastereomer analogues of C34L peptide corresponding to the HIV-1 gp41 HR2 domain with 2, 3 or all residues replaced by D amino-acids. Our objective was to design peptides that had: i) the capacity to interact with the HIV-1 gp41 HR1 domain, ii) a propensity to adopt a helical structure, iii) increased stability in the presence of enzymatic activities and iv) antiviral activities.

Synthesized C34L, C34M2 and C34M3 peptides were purified to homogeneity. Their amino-acid analysis after acid hydrolysis gave values consistent with the expected amino acid composition and were in agreement with MALDI-TOF analysis. Structural characterizations

of these peptides by circular dichroism revealed their propensity to fold in α helical structures as showed by the presence of a double minimum at 208 and 222nm on their respective spectra. Notably, the CD spectrum in TFE of all assembled D amino-acid peptide C34D showed an α -helix structure with a mirror ellipticity at 208 and 222 nm when compared with the spectra obtained with C34L, C34M2 or C34M3 peptides. This observation indicated that the α helical structure of C34L peptide seemed to be chirality independent. Interestingly, this α -helical structure of C34 peptide analogues is observed only when the CD analysis is performed in TFE, which is known as an apolar helix-promoting solvent. However, even in aqueous solution, when CD analysis of C34L, C34M2 and C34M3 were performed in the presence of an equimolar amount of N36 peptide corresponding to the HR1 domain, CD spectra clearly showed an α -helical structure for each complex. These induced ordered structures indicate that N36 peptide is able to interact with C34L, C34M2 and C34M3 presumably to form a six-helix bundle (6HB). This interpretation is in agreement with our data showing the capacity of C34L and N36 peptides to form oligomers in SDS-PAGE electrophoresis, corresponding to an association of trimers of C34L and N36 peptides (data not shown). Further, we showed that modifications introduced in C34M2, but not in C34M3, enhanced its stability in a physiological medium, as shown in human serum, and its resistance to trypsin treatment. C34M2 has a half-life of 133 min which is about twice that of C34L peptide ($T_{1/2}$ is 78min). In human serum, this peptide remains twice stable as its C34L analogue. This enhancement of the stability of C34M2 can be explained by the effect of the introduction of D-amino acids at the sensitive trypsin cleavage site (after Lys655). In contrast, the additional modifications, specifically of the L-Lys at position 634 instead of L-Glu, led to a rapid weakening of C34M3 peptide, as shown by its short half-life of less than 15 min. Taking the latter result into account, synthesis of the same peptide with a D-Lys at position 634 is now underway. All C34 peptide analogues but C34D and RI were able to block HIV-1 replication of both CCR5 and CXCR4 tropic viruses. These inhibitions were mediated by blocking virus penetration as suggested by their capacities to inhibit syncytium formation. The data obtained with C34M2 are very promising as they show that the introduction of D-aa at some critical sites i) enhanced the stability of the peptide in human sera, ii) increased peptide resistance to trypsin cleavage, iii) enhanced the solubility of this peptide, and iv) did not interfere with the antiviral activity of the peptide, which remained active with IC_{50} at nM levels. The improvement of the solubility of C34M2 to 70 μ M versus 11 μ M for the C34L makes this peptide worthy of consideration for clinical development. This point is critical

since peptides, even with high antiviral activity but low solubility, are incompatible with clinical use, as is the case for T-1249 and T649.^[27] Similarly the obtention of D-amino acids peptide but with low antiviral activity remains unattractive for clinical application, as was the case for the first D peptide reported by Eckert et al., which inhibited HIV entry with modest potency (IC₅₀: 10 μ M). However, more recent data reported by Lee and Welch^[48, 51] show that partial or total D-amino acids substitutions can also generate molecules with strong antiviral activities. Thus, it would be interesting to introduce the same modification as that performed by Lee and al. into our C34M2 peptide.

Overall, our data showed that partial D-amino acid substitutions in the C34 sequence, if correctly placed at some critical sites, can help to increase the stability of the peptides without altering their antiviral activity. Our objective will be to continue to develop this approach to design new peptides with efficient antiviral activity and without the limitation of T20 peptide. A great challenge for future studies will be to develop peptide inhibitors able to interact with HR1 domain with high affinity and having high stability and solubility.

Experimental Section

Docking calculations The gp41 ectodomain structures were selected for calculation of docking of the C34L peptide to the three N36. The structure was retrieved from the Protein Data Bank (1AIK PDB accession code).^[36] AutoDock Tools were used to assign Gasteiger partial charges to C34L and N36 peptides and to construct a grid map of 90x90x126 points with a grid-point spacing of 0.420 Å. The maps were centred on the C34L-N36 contact surface. AutoGrid 4.0 was used to calculate the grid maps. Rigid docking calculations were performed with AutoDock4^[37] using the known crystallographic conformation of the C34L peptide for the ligand coordinates. Two hundred dockings were performed with the Lamarckian Genetic Algorithm using a population size of 50 individuals with a total of 5x10⁷ energy evaluations. The crystallographic coordinates of the C34-N36 complex were used as the reference structure to evaluate the predicted docked structures.

Peptide synthesis The peptides were automatically synthesized in parallel on Rink amide-Gly-MBHA resin (330mg) with low loading (0.3 mmol.g⁻¹) on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer by using Fmoc chemistry. The MBHA resin HL (loading: 0.77 mmol.g⁻¹, Novabiochem) was solvated by successive washing steps with Dichloromethane (DCM) (3x 1min), 10% TFA in DCM (1x10 min), 1% DIEA (3x 1min), DCM (3x1min) and DMF (3x1). Fmoc-Gly-OH (0.1 mmol) pre-activated with TBTU/HOBt/DIEA (1:1:1.5) in DMF was

coupled. After 2 hours, the resin was washed with DMF (3x1min) and DCM (3x1) and the free amino groups were capped with acetic anhydride/DIEA/DMF (3:1:16) (2x30min). The resin was washed with DMF (3X1min) and the Fmoc group was removed with 50% piperidin/DMF (3x5 min). Rink amide linker was coupled after preactivation with TBTU/HOBt/DIEA (1:1:1.5) in DMF. Fmoc/tBu protected amino acids (Iris Biotech GmbH) were incorporated using standard procedures and TBTU/HOBt/DIEA as coupling agents. Fmoc group was removed by treatment with 22 % piperidine and 0.07% Triton® X-100 in DMF. After final deprotection, peptides were acetylated by anhydride acetic treatment (40 eq., 9 eq. of DIEA, DMF). Concomitant side-chain deprotection and cleavage was performed by treatment with a mixture of trifluoroacetic acid (TFA)/H₂O/triisopropylsilane/ethanedithiol (92:4:2:2 v/v/v/v) (5ml) at 0°C for 30 min and at room temperature for 1.5 hour. TFA was removed by evaporation and the crude peptide was precipitated with tert-butyl methyl ether. The products were characterized by HPLC, amino acid analysis and MALDI-TOF mass spectrometry.

Synthesis was carried out with either L- or D-amino acids and the sequences obtained are described in table 1.

For all peptides, purified peptides were obtained after the synthesis on Rink amide-MBHA resin (0.03 mmol). Purification was performed on an initial gradient of 10-30% ACN with 0.5 % TFA for 5 min, followed by a linear gradient from 30% to 60% (AcC34L); 30 to 47% (AcC34D); 35 to 55% (AcC34M2), 30 to 50% (AcC34M3 and N36) of ACN with 0.5 % TFA for 20 min using a flow of 10 mL/min; UV detection was performed at 220 nm.

HPLC analysis The purity of the peptides was analyzed by analytic reverse phase (RP) HPLC using a Symmetry C₁₈ column (3.9 mm x 150 mm, Waters) with a particle size of 5 µm and a pore size of 100 Å. The peptides were purified using a Symmetry® C18 (30 mm x 100 mm, Waters) with a particle size of 5 µm. Flow rates (1 ml.min⁻¹ and 10 ml.min⁻¹) were used for analytical and semi-preparative scales respectively. Detection was performed at 220 nm with an UV detector. Solvent system A: 0.045% TFA in water for analytical HPLC and 0.1% TFA in water for semi-preparative HPLC; solvent system B: 0.036% TFA in acetonitrile for analytical HPLC and 0.1% TFA in acetonitrile for semi-preparative HHPLC.

Circular dichroism analysis The spectra were recorded on a JASCO J-810 spectropolarimeter with the CDF-426S Peltier unit using a quartz cuvette optical path length teflon stopper (0.1 cm). The peptide solutions were dissolved in phosphate buffer, pH 7.4 (10 mM potassium

phosphates, 50 mM potassium fluoride). Peptides at 56 μM were dissolved in aqueous buffer or in the presence of 30% of trifluoroethanol. All analogues were soluble in these buffers at this concentration except C34L and C34D. The N36 peptide aggregated at concentrations higher than 10 μM . The equimolar mixture of N36 and C34 analogues were previously dissolved in ammonium carbonate (100 mM, pH 8.0), neutralized with acetic acid (1 M) and lyophilized. The dry samples were dissolved in phosphate buffer at pH 7.4 (10 μM). The measurement was performed between 190-260 nm with a data pitch of 0.2 nm, a band width of 1 nm and a scanning speed of 20 nm/min for 3 accumulations. All spectra were corrected by subtracting the buffer spectrum. The CD data were expressed as the molar ellipticity $[\theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) calculated:^[38, 39]

$$[\theta] = \frac{\theta}{10Cl}$$

Where, θ is the ellipticity in mdegrees), C is the molar concentration and l is the path length of the cell in cm.

The experiments on the thermal stability of the equimolar mixtures were performed at constant heating rates of 90°C/h and a response time of 1 sec. The measurements were acquired in a range of 10-80°C with a data pitch of 0.5°C monitoring the ellipticity at 222 nm. The thermal denaturation experiment was repeated twice with new samples.

Enzymatic hydrolysis Each peptide was dissolved (up to 100 μM) in ammonium bicarbonate buffer (50 mM, pH 8.5). Trypsin (Promega, mass spectrometry grade) was added at a molar peptide:trypsin ratio of 1:1500. The hydrolysis was performed by incubation at 37°C. To monitor the enzymatic reaction, aliquots (50 μl) were harvested at different times between 0 and 5 h and the last aliquot 48 later. The reaction was stopped by adding acetic acid (150 μl , 1 M) and the sample was immediately stored at 20°C or processed for mass spectrometry and chromatography analysis. A similar protocol was used for chymotrypsin digestion. Each aliquot was analyzed by RP-HPLC using a Symmetry® C18 column and MALDI-TOF mass spectrometry.^[40] The diluted samples were eluted with a linear gradient of 0-70% acetonitrile (with 0.036% of trifluoroacetic acid in acetonitrile and 0.045% of trifluoroacetic acid in water). The relative amount of unhydrolysed peptide was determined from peak area.

Considering that the enzymatic reaction follows first order kinetics,

$$\ln C = \ln C_0 - K_e t$$

where C is the concentration, which is proportional to the HPLC peak area expressed as percentage; C₀ is the initial concentration; K_e is the experimental constant and t is the time (min). The half-life (t_{1/2}) was calculated from the K_e obtained using the following relation:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_e}$$

Viruses The X4 HIV-1 LAI was obtained from Diagnostic Pasteur (Marne la Coquette, France) as supernatant containing 10⁵ TCID₅₀.ml⁻¹. The R5 HIV-1 BaL and VN44 X4 were obtained from Dr H.HOCINI (ANRS, France). These viruses were amplified on monocytes, derived macrophages or lymphocytes. The virus harvested at day 7 post-infection was titrated, aliquoted (100 ng of p24/ml) and stored at -80 C° until use.

Isolation of monocytes and differentiation in macrophages Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from the buffy coat of healthy HIV-negative donors were isolated in a ficoll density gradient (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden). The cells were then plated at a density of 5.10⁶ cells/well in 24-well tissue culture plates and maintained at 37°C, 5% CO₂. After 45 min, non-adherent cells were removed and the remaining cells were washed three times with Hank's buffered salt solution and incubated in medium containing 90% Iscove modified Dulbecco's medium, 10% Fetal Calf Serum, 1% Macrophage Colony-Stimulating Factor and a 1% penicillin-streptomycin mixture. The medium was changed every 3 days. On day 7, differentiated macrophages were infected with HIV-1.

Cell lines HeLaCD4-CCR5/CXCR4-LTR/β-gal cells, a gift from Dr. P. Charneau (Pasteur Institute, Paris, France), are HeLa cells stably expressing human CD4, human CCR5 or CXCR4 coreceptor and containing the *LacZ* gene under the control of the HIV-1 LTR promoter. HeLa-gp120/gp41LAI or HeLa-gp120/gp41ADA are HeLa cells stably expressing gp160 from HIV-1 LAI or HIV-1 ADA isolates. They were grown in complete Dulbecco's modified eagle medium in the presence of geneticin (1 mg.ml⁻¹) for HeLaCD4-LTR/β-gal or 1μM of methotrexate for HeLa-gp120/gp41LAI and HeLa-gp120/gp41ADA.

Syncytium formation The synthesized C34 peptide analogues were tested at different concentrations (10⁻⁶ M to 10⁻¹¹ M) for their ability to inhibit syncytium. HeLa-CD4-CCR5 or HeLa-CD4-CXCR4 (10000 cells) were cocultured with HeLa-gp120/gp41LAI or HeLa-gp-

120/gp41ADA (10000 cells) in 96-well plates in the presence of various concentrations of each peptide. After 20 h, syncytia were scored by contrast phase microscopy.

β-gal test Cells were washed twice with PBS (0.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂), fixed with 0.5% glutaraldehyde for 10 min and washed twice with PBS. They were incubated for 3 h in a mixture (1 mg.ml⁻¹ X-Gal in PBS) containing potassium ferricyanide (5 mM), potassium ferrocyanide (5 mM) and MgCl₂ (2 mM). The reaction was stopped by removing the X-Gal reaction solution.

Infectivity assays PBMC were isolated from buffy coat of healthy humans as described above. Cells were incubated with HIV-1LAI (0.3 ng)or HIV-1BaL (0.3 ng) for 2 h at 37°C in 2% FCS medium in the presence of different amounts of peptides. Infected cells were then washed twice with FCS-free medium and cultured in the presence of peptides in 10% FCS. Every three days, the supernatant was harvested and tested for p24 (Innotest™ HIV Antigen mAB-INNOGENETICS)

Peptide stability in the presence of human serum In order to test the stability of C34 and its analogue peptides in human sera, each peptide (100 µg) was incubated at 37°C for different times and tested for the conservation of its capacity to inhibit syncytium formation and HIV-1 replication as described above.

Water solubility determination

The water solubility of the peptide was determined by amino acid analysis. Peptide (1 mg) was dissolved in ammonium carbonate 10 mM at pH 8.0. The solution was neutralized with acetic acid (1N) to obtain pH 7.0, and was lyophilized. The sample was re-dissolved in water (1 ml) and was incubated for 12 h at 8°C. The suspension was centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The supernatant was filtered through a 0.2 µm filter. The concentration of an aliquot of 500 µl was determined by amino acid analysis.

Acknowledgments:

This work was supported by SIDACTION, MRT and University Paul SABATIER.

References:

- [1] A. G. Dalgleish, P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves and R. A. Weiss, *Nature*, **1984**, 312, 763-767.
- [2] D. Klatzmann, E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruet, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman and L. Montagnier, *Nature*, **1984**, 312, 767-768.
- [3] J. P. Moore, *Science*, **1997**, 276, 51-52.
- [4] M. Bendjennat, B. Bahbouhi and E. Bahraoui, *Biochemistry*, **2001**, 40, 4800-4810.
- [5] D. Einfeld, *Curr Top Microbiol. Immunol.* **1996**, 214, 133-176.
- [6] E. Fenouillet, B. Clerget-RasLAIN, J. C. Gluckman, D. Guetard, L. Montagnier and E. Bahraoui, *J. Exp. Med.* **1989**, 169, 807-822.
- [7] R. W. Doms and J. P. Moore, *J. Cell. Biol.* **2000**, 151, F9-14.
- [8] W. Weissenhorn, A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel and D. C. Wiley, *Nature*, **1997**, 387, 426-430.
- [9] T. Muster, R. Guinea, A. Trkola, M. Purtscher, A. Klima, F. Steindl, P. Palese and H. Katinger, *J. Virol.* **1994**, 68, 4031-4034.
- [10] P. Chambers, C. R. Pringle and A. J. Easton, *J. Gen. Virol.* **1990**, 71 (Pt 12), 3075-3080.
- [11] A. Holguin, E. R. De Arellano and V. Soriano, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **2007**, 23, 1067-1074.
- [12] B. K. Felber, M. Hadzopoulou-Cladaras, C. Cladaras, T. Copeland and G. N. Pavlakis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 1495-1499.
- [13] Y. Klinger, A. Aharoni, D. Rapaport, P. Jones, R. Blumenthal and Y. Shai, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 13496-13505.
- [14] M. Pritsker, P. Jones, R. Blumenthal and Y. Shai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1998**, 95, 7287-7292.
- [15] C. H. Chen, T. J. Matthews, C. B. McDanal, D. P. Bolognesi and M. L. Greenberg, *J. Virol.* **1995**, 69, 3771-3777.
- [16] M. K. Lawless, S. Barney, K. I. Guthrie, T. B. Bucy, S. R. Petteway, Jr. and G. Merutka, *Biochemistry*, **1996**, 35, 13697-13708.
- [17] C. T. Wild, D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal and T. J. Matthews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 9770-9774.
- [18] T. Matthews, M. Salgo, M. Greenberg, J. Chung, R. DeMasi and D. Bolognesi, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, 3, 215-225.
- [19] S. Liu, H. Lu, J. Niu, Y. Xu, S. Wu and S. Jiang, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 11259-11273.
- [20] I. Munoz-Barroso, S. Durell, K. Sakaguchi, E. Appella and R. Blumenthal, *J. Cell. Biol.* **1998**, 140, 315-323.
- [21] S. A. Gallo, A. Puri and R. Blumenthal, *Biochemistry*, **2001**, 40, 12231-12236.
- [22] Y. He, R. Vassell, M. Zaitseva, N. Nguyen, Z. Yang, Y. Weng and C. D. Weiss, *J. Virol.* **2003**, 77, 1666-1671.
- [23] G. B. Melikyan, R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert and F. S. Cohen, *J. Cell. Biol.* **2000**, 151, 413-423.
- [24] L. T. Rimsky, D. C. Shugars and T. J. Matthews, *J. Virol.* **1998**, 72, 986-993.
- [25] L. Xu, A. Pozniak, A. Wildfire, S. A. Stanfield-Oakley, S. M. Mosier, D. Ratcliffe, J. Workman, A. Joall, R. Myers, E. Smit, P. A. Cane, M. L. Greenberg and D. Pillay, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 1113-1119.
- [26] J. J. Eron, R. M. Gulick, J. A. Bartlett, T. Merigan, R. Arduino, J. M. Kilby, B. Yangco, A. Diers, C. Drobnes, R. DeMasi, M. Greenberg, T. Melby, C. Raskino, P. Rusnak, Y. Zhang, R. Spence and G. D. Miralles, *J. Infect. Dis.* **2004**, 189, 1075-1083.

- [27] J. P. Lalezari, N. C. Bellos, K. Sathasivam, G. J. Richmond, C. J. Cohen, R. A. Myers, Jr., D. H. Henry, C. Raskino, T. Melby, H. Murchison, Y. Zhang, R. Spence, M. L. Greenberg, R. A. Demasi and G. D. Miralles, *J. Infect. Dis.* **2005**, 191, 1155-1163.
- [28] J. J. Dwyer, K. L. Wilson, D. K. Davison, S. A. Freel, J. E. Seedorff, S. A. Wring, N. A. Tvermoes, T. J. Matthews, M. L. Greenberg and M. K. Delmedico, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104, 12772-12777.
- [29] J. J. Dwyer, K. L. Wilson, K. Martin, J. E. Seedorff, A. Hasan, R. J. Medinas, D. K. Davison, M. D. Feese, H. T. Richter, H. Kim, T. J. Matthews and M. K. Delmedico, *Protein. Sci.* **2008**, 17, 633-643.
- [30] C. A. Bewley, J. M. Louis, R. Ghirlando and G. M. Clore, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 14238-14245.
- [31] S. Y. Hong, J. E. Oh and K. H. Lee, *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 58, 1775-1780.
- [32] D. Bang, G. I. Makhataдзе, V. Tereshko, A. A. Kossiakoff and S. B. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 3852-3856.
- [33] F. I. Valiyaveetil, M. Sekedat, R. Mackinnon and T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101, 17045-17049.
- [34] B. Anil, B. Song, Y. Tang and D. P. Raleigh, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13194-13195.
- [35] B. Anil, R. Craig-Schapiro and D. P. Raleigh, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3144-3145.
- [36] D. C. Chan, D. Fass, J. M. Berger and P. S. Kim, *Cell*, **1997**, 89, 263-273.
- [37] R. Huey, G. M. Morris, A. J. Olson and D. S. Goodsell, *J. Comput. Chem.* **2007**, 28, 1145-1152.
- [38] N. J. Greenfield, *Methods Enzymol.* **2004**, 383, 282-317.
- [39] N. Sreerama and R. W. Woody, *Methods Enzymol.* **2004**, 383, 318-351.
- [40] Bryan John Smith (2003) Enzymatic Cleavage of proteins. In Protein sequencing protocols, pp. 49-62, Humana Press, Totowa, New Jersey
- [41] D. C. Chan and P. S. Kim, *Cell*, **1998**, 93, 681-684.
- [42] D. C. Chan, C. T. Chutkowski and P. S. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 15613-15617.
- [43] J. D. Reeves, F. H. Lee, J. L. Miamidian, C. B. Jabara, M. M. Juntilla and R. W. Doms, *J. Virol.* **2005**, 79, 4991-4999.
- [44] S. K. Sia, P. A. Carr, A. G. Cochran, V. N. Malashkevich and P. S. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 14664-14669.
- [45] J. K. Judice, J. Y. Tom, W. Huang, T. Wrin, J. Vennari, C. J. Petropoulos and R. S. McDowell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 13426-13430.
- [46] B. S. Jin, J. R. Ryu, K. Ahn and Y. G. Yu, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **2000**, 16, 1797-1804.
- [47] D. M. Eckert, V. N. Malashkevich, L. H. Hong, P. A. Carr and P. S. Kim, *Cell*, **1999**, 99, 103-115.
- [48] B. D. Welch, A. P. VanDemark, A. Heroux, C. P. Hill and M. S. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, 104, 16828-16833.
- [49] G. Guichard, S. Muller, M. van Regenmortel, J. P. Briand, P. Mascagni and E. Giralt, *Trends Biotechnol.*, **1996**, 14, 44-45.
- [50] M. Chorev and M. Goodman, *Trends Biotechnol.* **1995**, 13, 438-445.
- [51] M. K. Lee, H. K. Kim, T. Y. Lee, K. S. Hahm and K. L. Kim, *Exp. Mol. Med.* **2006**, 38, 18-26.

Figures legend

Figure 1 3D representation of C34L helix and representation of docking energy

a. Representation of helix C34L (grey ribbons) and two interacting N36 peptides (green surface) derived from 1AIK PDB file. The yellow residues label the positions directly involved in the interaction with N36 according with the docking calculations. The red residues show the positions which were substituted in the C34L analogues. b. Energy of docking curve for all residues of C34L calculated with AutoDock4.

Figure 2 Circular dichroism spectra of the various peptides and N-C complexes

a: Circular dichroism spectra of C34L (black) and C34D (grey) peptide. b. Circular dichroism spectra of C34L (black), C34M2 (cyan) and C34M3 (red) peptides. Peptides were used at 56 μM in 30% TFE, 10 mM potassium phosphate, 50 mM potassium fluoride pH 7.4. Spectra were recorded at 25°C. c. Enlargement of the C34M2 and C34M3 spectra. d. CD spectra of peptides in an equimolar mixture of N36+C34L (d), N36+C34M2 (e), N36+C34M3 (f) or N36+peptide control (g). Spectra were obtained in aqueous solution. The apparition of a maximum at 192 nm and a double minimum at 208 nm and 222 nm were used as indicators of peptide interactions and of the formation of α -helical structure.

Figure 3 Curves of thermal stability of the various N-C complexes

Curves of thermal stability were obtained by monitoring the molar ellipticity at 222 nm. The curves of the complexes of N36 with C34L (a), C34M2 (b) and C34M3 (c) were obtained from the dissolution of the equimolar mixtures at 10 μM in phosphate buffer 10 mM, potassium fluoride 10 mM at pH 7.4. The curves of the right hand side, in front of the mixture melting curves, show the first derivative and the maximum indicates the melting temperature.

Figure 4 Trypsin digestion of the various peptides

100 μM of each peptide was dissolved in 50 mM bicarbonate buffer at pH 8, in presence of trypsin at a molar ratio of 1/1500. The hydrolysis was performed at 37°C. Each aliquot, C34L (a-b), C34M2(c-d), C34M3(e-f) and C34D (g) was analyzed by RP-HPLC. The cleavage sites were identified for each peptide by MALDI-TOF mass spectrometry. Below each chromatograms, the cleavage sites (arrows) and the mass of the fragment expected are

indicated. Each fragment is denoted by a number used to indicate the corresponding chromatographical peak.

Figure 5 Kinetics of C34L, C34M2 and C34M3 peptide degradation

Peptides were incubated for various times with trypsin and the digestion products were then separated and quantified by RP-HPLC. For each peptide, the percentage of peptide integrity is reported versus the time of trypsin digestion. The half-life is calculated as described in the Material and methods section.

Figure 6 Kinetics of peptide degradation by chymotrypsin for C34L, C34M2, C34M3 and C34D peptides:

For each peptide, the % of peptide integrity is reported versus the time of chymotrypsin treatment.

Figure 7 Inhibition of syncytium formation in the presence of C34L peptide and its analogues

HeLa gp120/gp41ADA (a) or HeLa gp120/gp41LAI (b) cells were cocultivated with HeLa-P4P5 in 96-well plates in the presence of various concentrations of each peptide. After 20 h of coculture, syncytia were scored under optical microscopy.

Figure 8 Anti-HIV-1 activity of C34L and its analogues in a single infectivity assay

HeLaCD4-CCR5/CXCR4-LTR/ β -gal cells were infected for one viral cycle (20 h) with 0.1 ng of HIV-1 LAI (a) or BaL (b) as described in the Material and methods section. Viral replication was correlated directly with the transactivation of the *LacZ* gene by the early translated HIV-1 Tat gene. β -galactosidase activity was visualized by incubating cells with the substrate X-Gal which stained cells blue after being degraded.

Figure 9 Effect of the C34L peptide and its analogues on viral replication of X4 and R5 tropic viruses

Lymphocytes (a) or macrophages (b) were infected with 0.3 ng HIV VN44(X4 tropic) or BaL (R5 tropic) respectively for 3 h as described in the Material and methods section. Three days post infection, cell supernatants were collected and assayed by ELISA for p24 antigen. Uninfected cells treated in the same way were used as a control. No inhibition was observed with C34D or RI (data not shown).

SUPPORTING INFORMATION

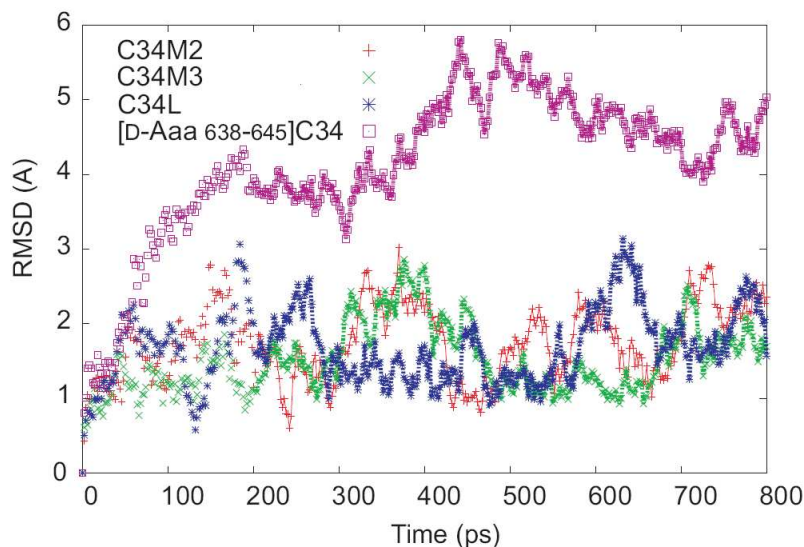
Molecular dynamic simulations of C34 analogues

Simulations were performed with GROMACS 3.2.1^[1, 2] using the ffG43a1 force field. For C34L peptide and analogues, the helical conformation of the crystal structure composed of the peptides N36 and C34 [1AIK PDB file] was selected as the starting conformation for all molecular dynamics calculations. The simulations were run at 300 K using the SPC water model.^[3] Peptides were placed in a rectangular box of water, leaving at least 1.0 nm between the walls and the peptides by using a three-dimensional periodic boundary condition. The initial velocities were generated at 300 K following a Maxwellian distribution. The simulations were performed at constant volume and temperature by weakly coupling the system to external temperature bath.^[4] All bonds were constrained by using the LINCS algorithm,^[5] and water molecules were kept rigid using the SETTLE algorithm.^[6]

Counter ions were included to neutralize the negative charge of peptides. A cut-off of 1.0 nm was used for the non-bonded interactions. The particle mesh Ewald method (PME) was used for computing long-range electrostatics.^[7] A time step of 2.0 fs was employed. Before starting the molecular dynamic calculation, the system was energy-minimized for 100 steps using the steepest descent algorithm. Initially, 300 ps of molecular dynamics calculation were performed using position restraints for protein atoms (force constant of $1000 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$) to equilibrate and thermalize the water molecules. Simulations were run for at least 800 ps. Structures were sampled every 20 ps. Analysis of the trajectories was performed using the programs included in the GROMACS package.

Molecular dynamics calculations were carried out for C34L, C34M2, C34M3 and [D-aa 638-645]C34 analogues in water. The last one was a C34L analogue with D-amino acid substitutions from Tyr 638 to Leu 645 residues. The conformational stability of the complexes composed of the N36 and C34 peptide analogues were analysed by computing the root-mean-square deviation (RMSD) of backbone atoms along the selected snapshots taken from the trajectory with respect to the initial conformation of N36-C34 complex. It can be seen that our C34L peptide, as well as C34M2 and C34M3, underwent little conformational change along the trajectory, suggesting that the three peptides remained in the helical conformation for the whole simulation time, as shown by the low variability of their RMSD values. Thus, these results indicate that the punctual sequence substitutions with D-amino acids introduced no significant distortion in the helix conformation. In contrast, when the same molecular dynamics was performed with a C34 analogue containing 8 D-amino acids, a greater variation of RMSD values was observed, indicating that the helical conformation around these residues was probably disturbed by the introduction of a large number of D-amino acid substitutions.

Figure 1. The conformational parameter RMSD of backbone atoms versus time in molecular dynamic simulations of C34 and analogues: C34L (*), C34M2 (+), C34M3 (x) and [D-Aaa 638-645]C34 (□).



- [1] E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel, *J. Mol. Mod.*, **2001**, 7, 306-317.
- [2] H.J.C Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, *Comp. Phys. Comm.*, **1995**, 91, 43-56.
- [3] G.D. Rose, L.M. Gierasch, J.A. Smith, *Adv. Protein Chem.*, **1985**, 37, 1-109.
- [4] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, A. DiNola, J. R. Haak, *J. Chem. Phys.*, **1984**, 81, 3684-3690.
- [5] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. G. E. M. Fraaije, *J. Comp. Chem.*, **1997**, 1463-1472.
- [6] Y. Nitahara-Kasahara, M. Kamata, T. Yamamoto, X. Zhang, Y. Miyamoto, K. Muneta, S. Iijima, Y. Yoneda, Y. Tsunetsugu-Yokota, Y. Aida, *J Virol*, **2007**, 81, 5284-5293.
- [7] U. Essman, L. Perela, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, **1995**, 103, 8577-8592.

Figure 1 3D representation of C34L helix and representation of docking energy

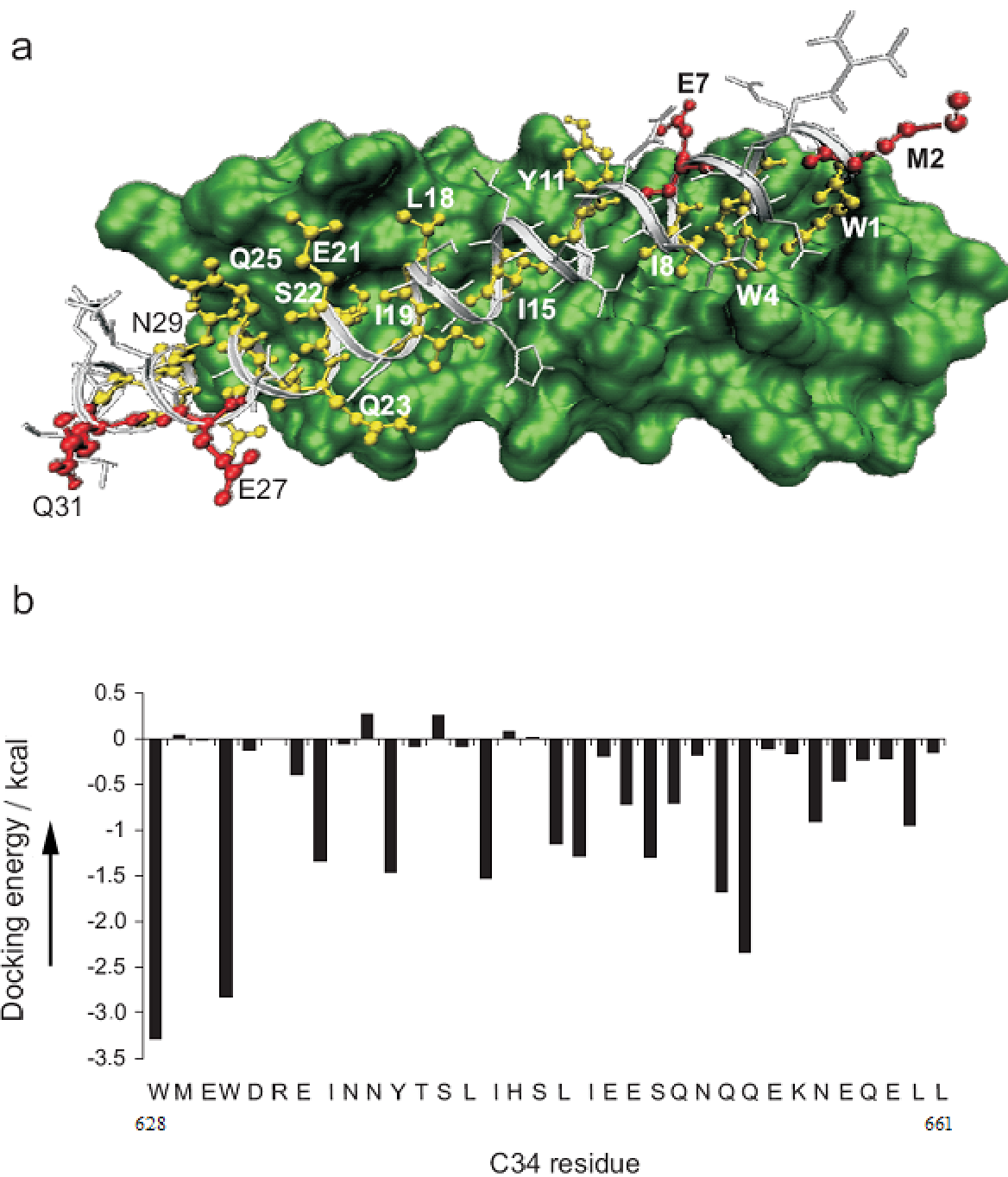


Figure 2 Circular dichroism spectra of the different peptides and N-C complexes

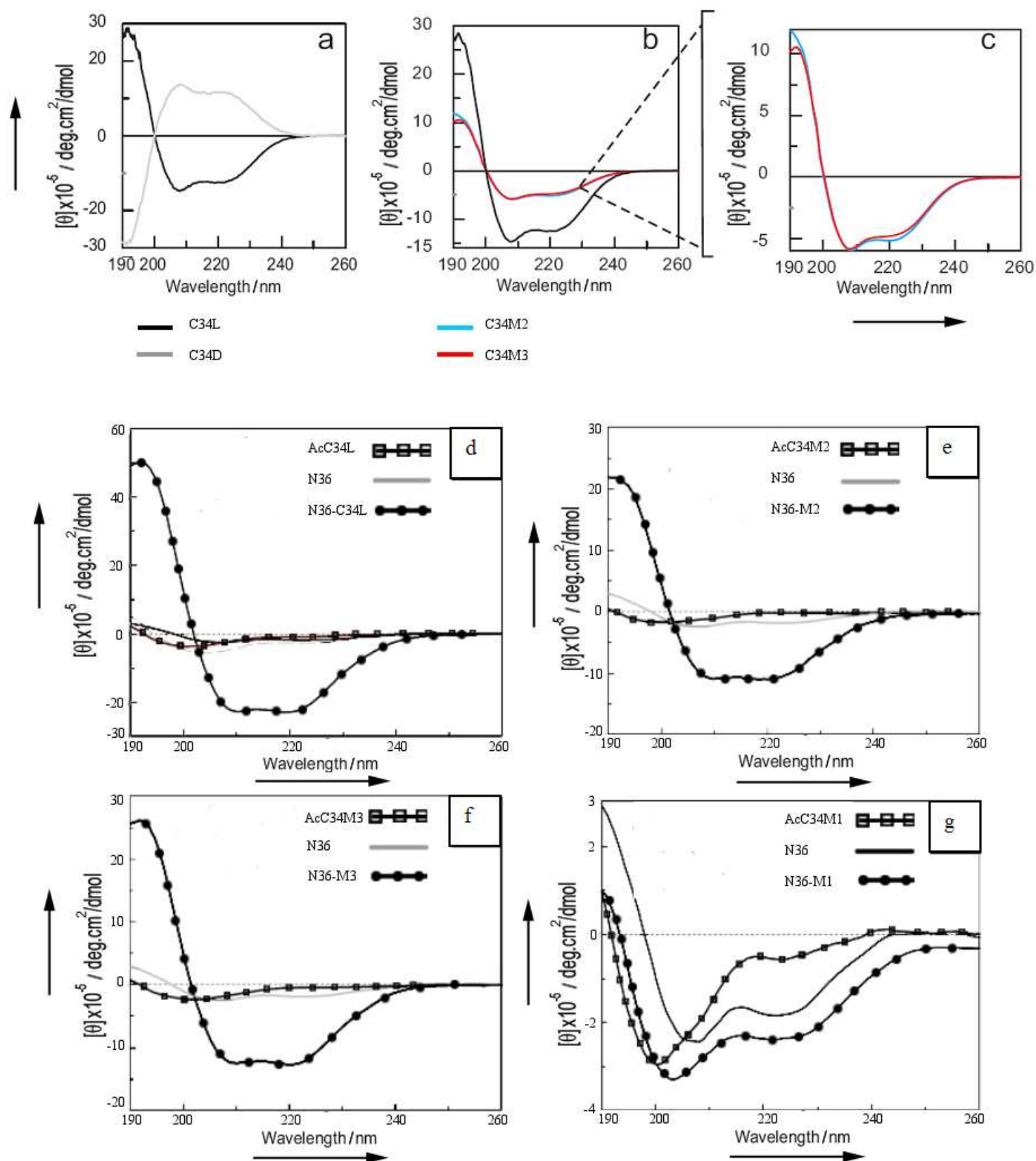


Figure 3 Curves of thermal stability of the different N-C complexes

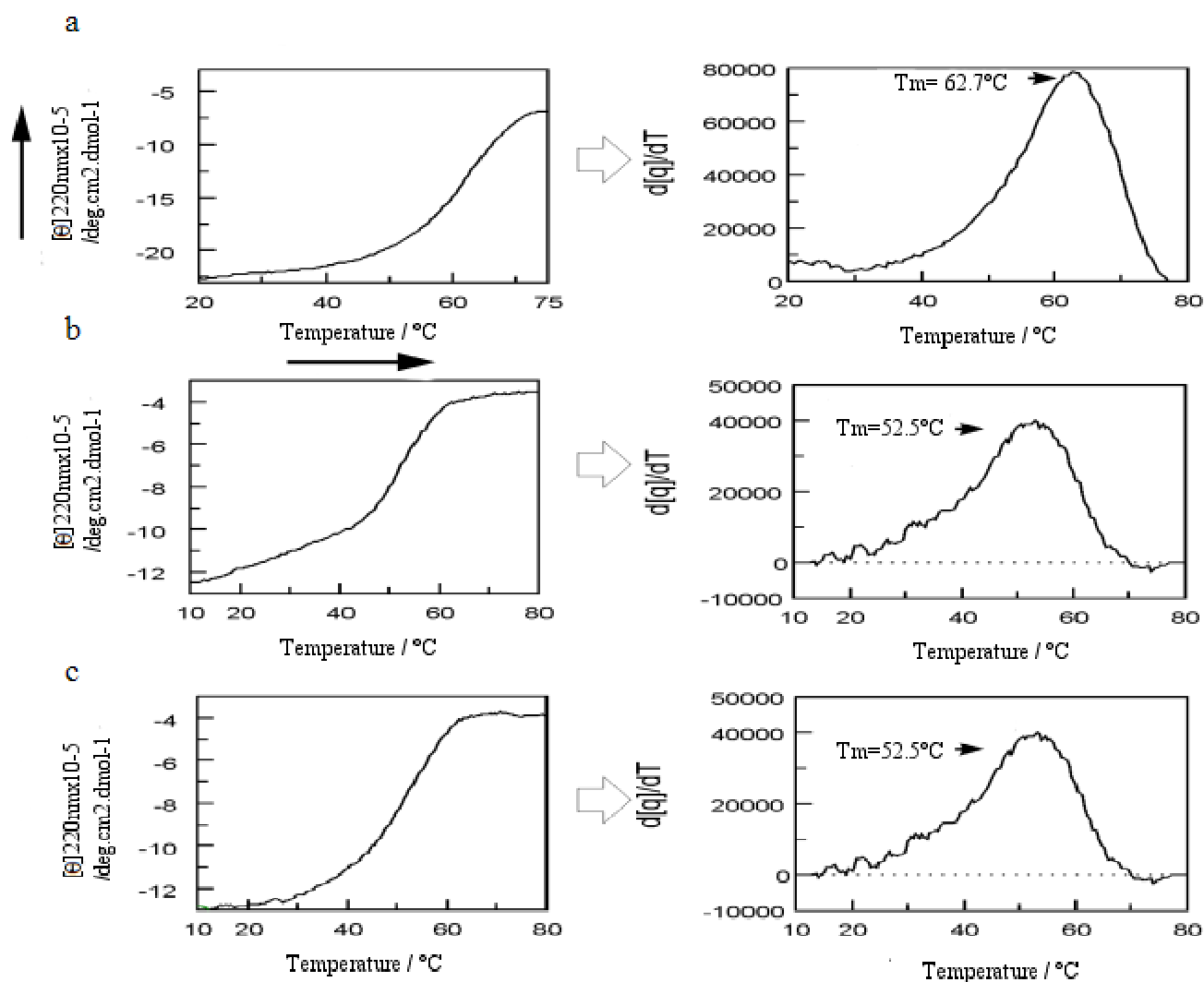


Figure 4 Trypsin digestion of the various peptides

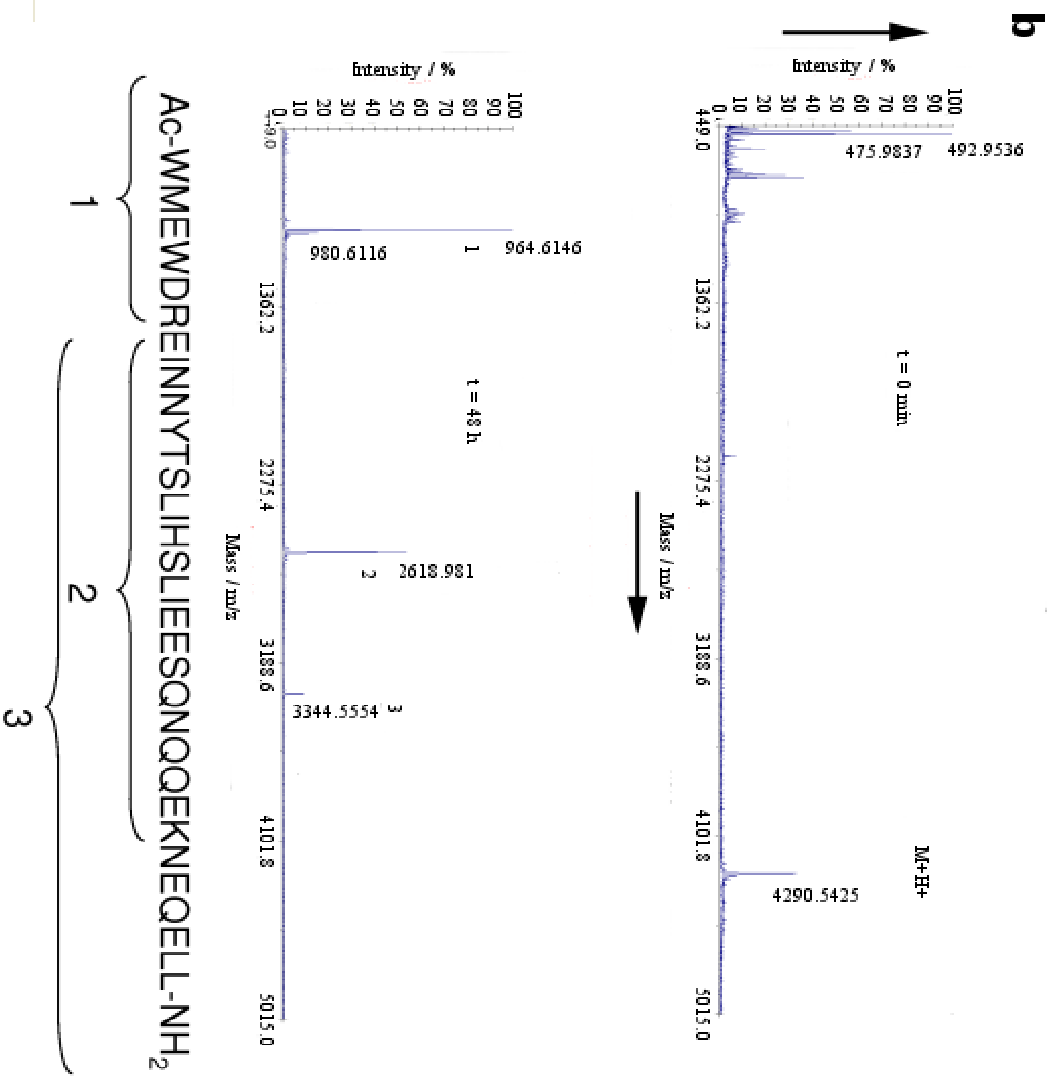
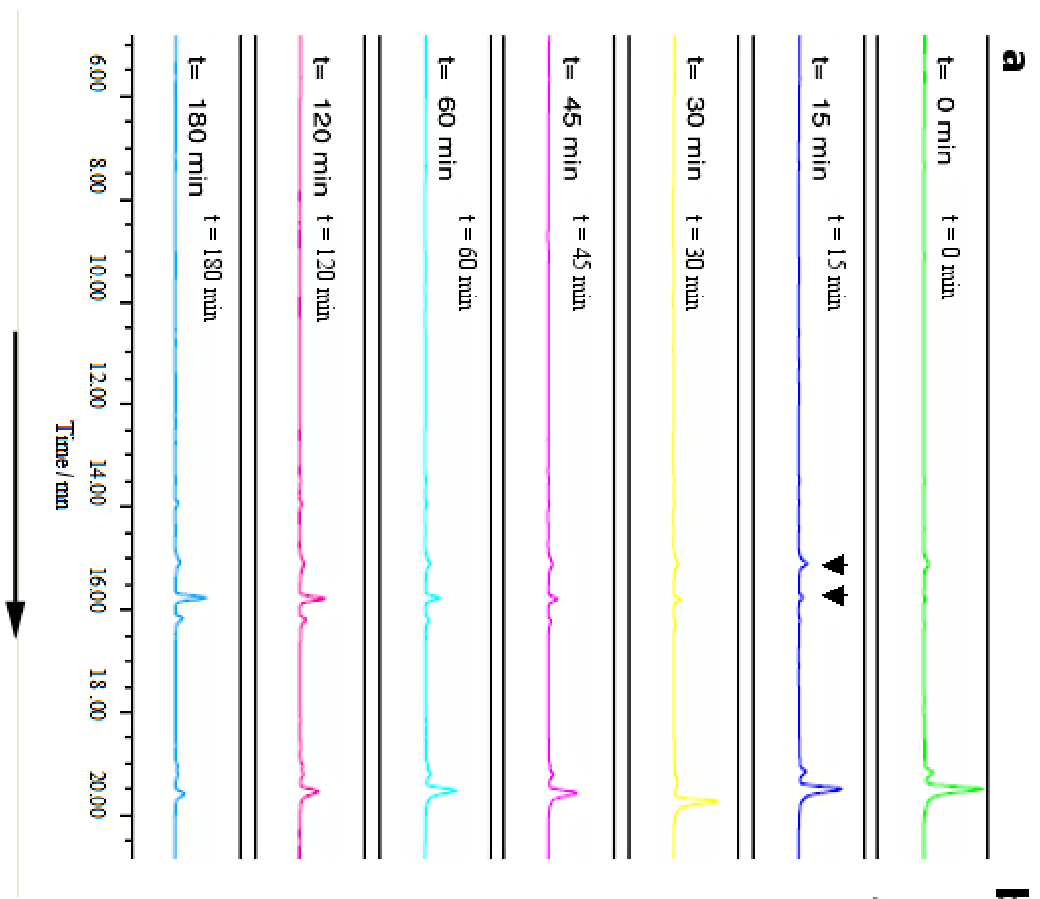
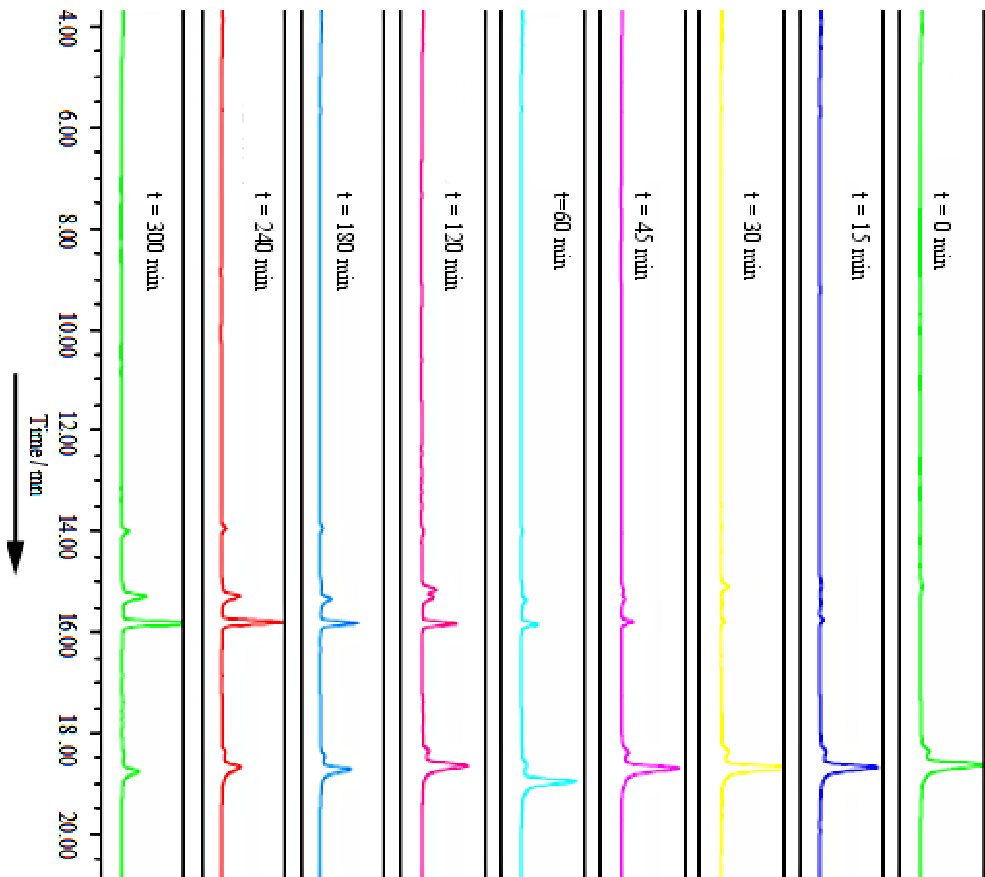


Figure 4 Trypsin digestion of the various peptides
c



d Acc34 M2 MALDI spectra

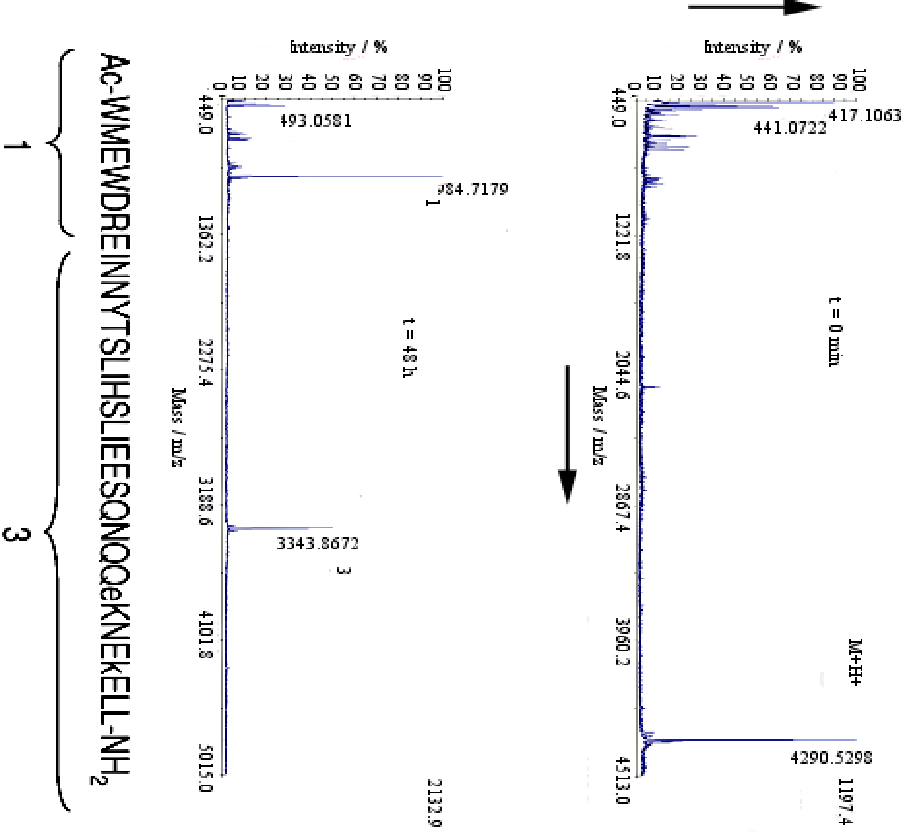
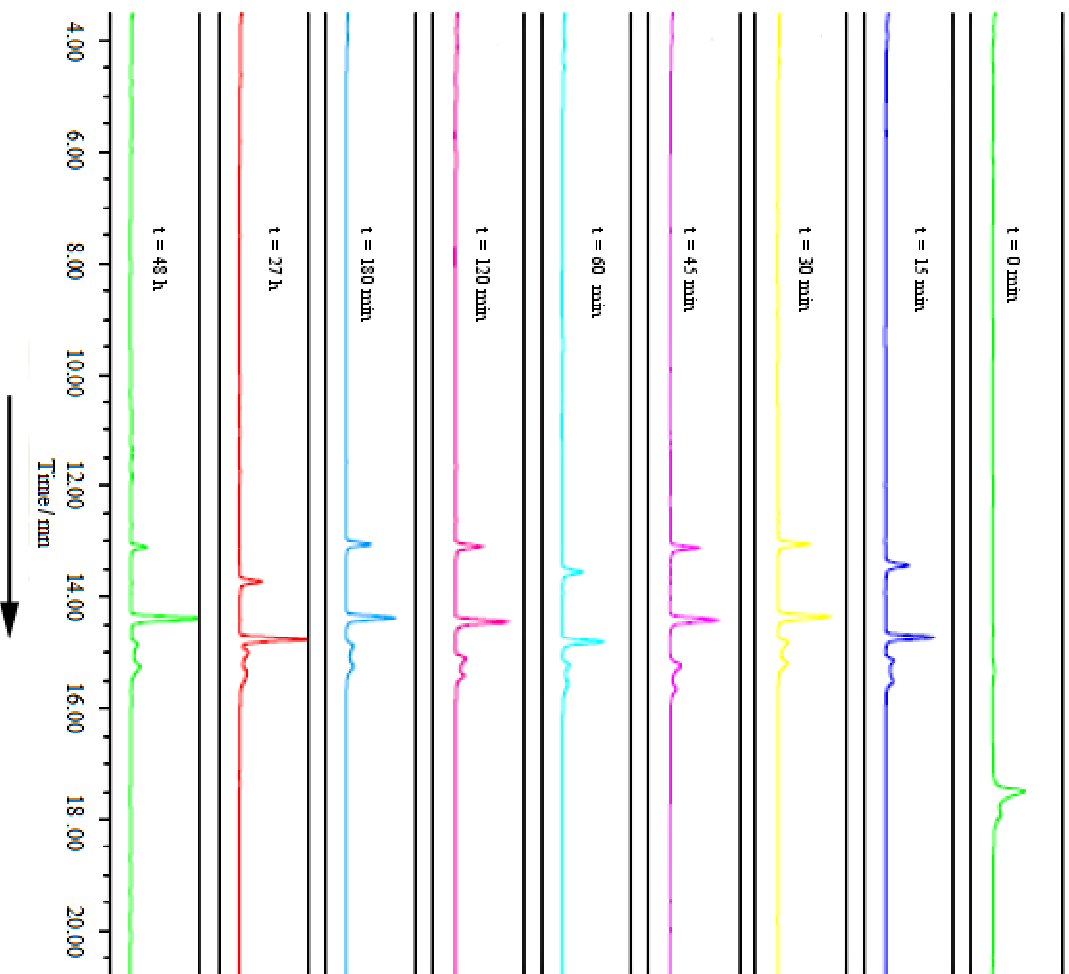


Figure 4 Trypsin digestion of the various peptides
e



f

ACC34 M3 MALDI spectra

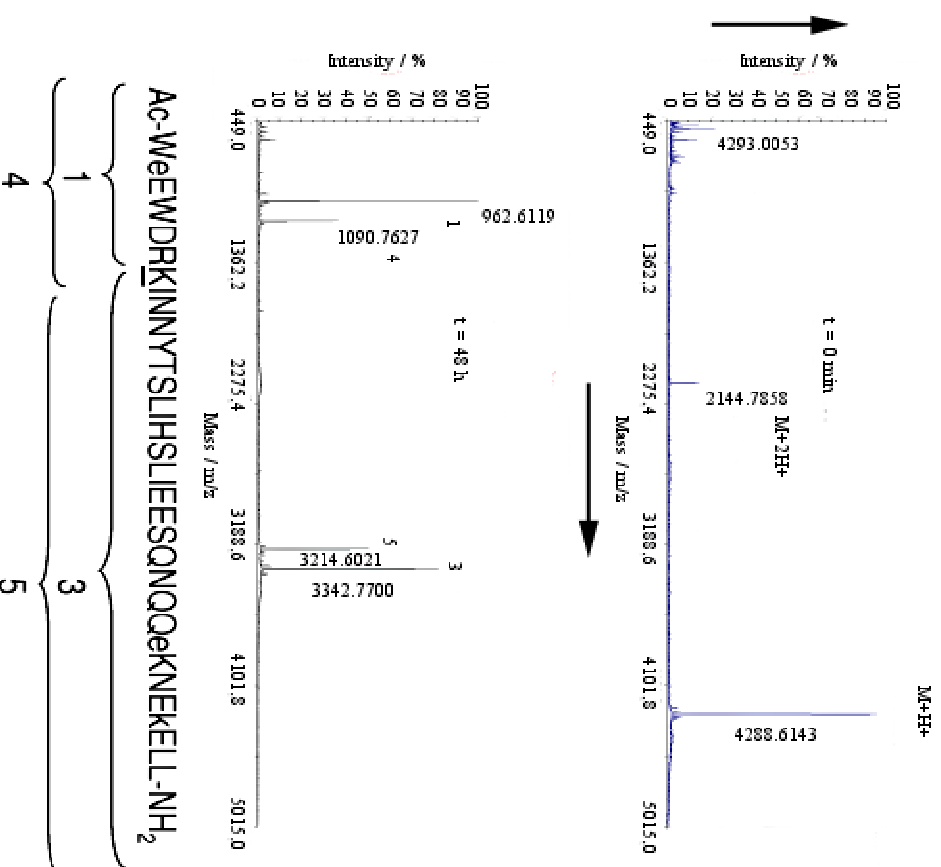


Figure 4 Trypsin digestion of the various peptides

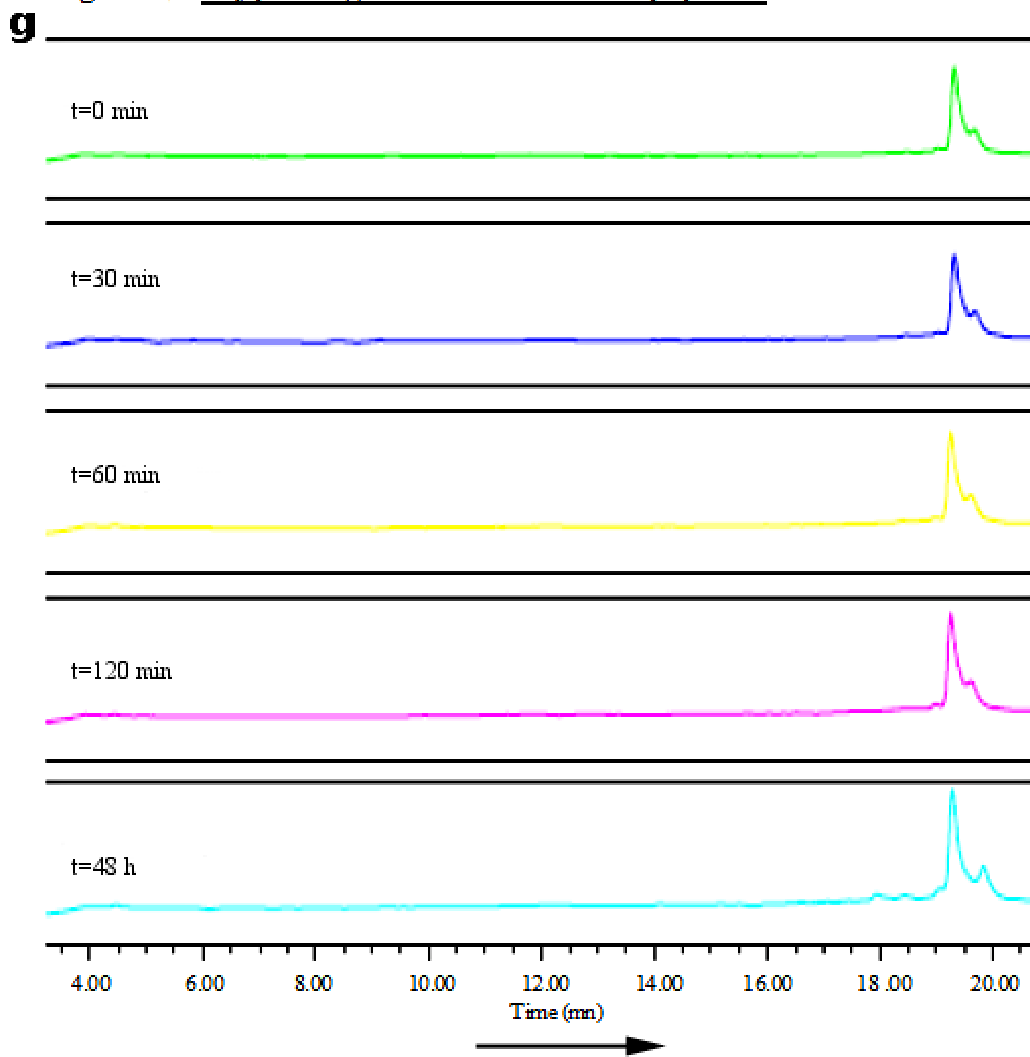


Figure 5 Kinetics of C34L, C34M2 and C34M3 peptide degradation

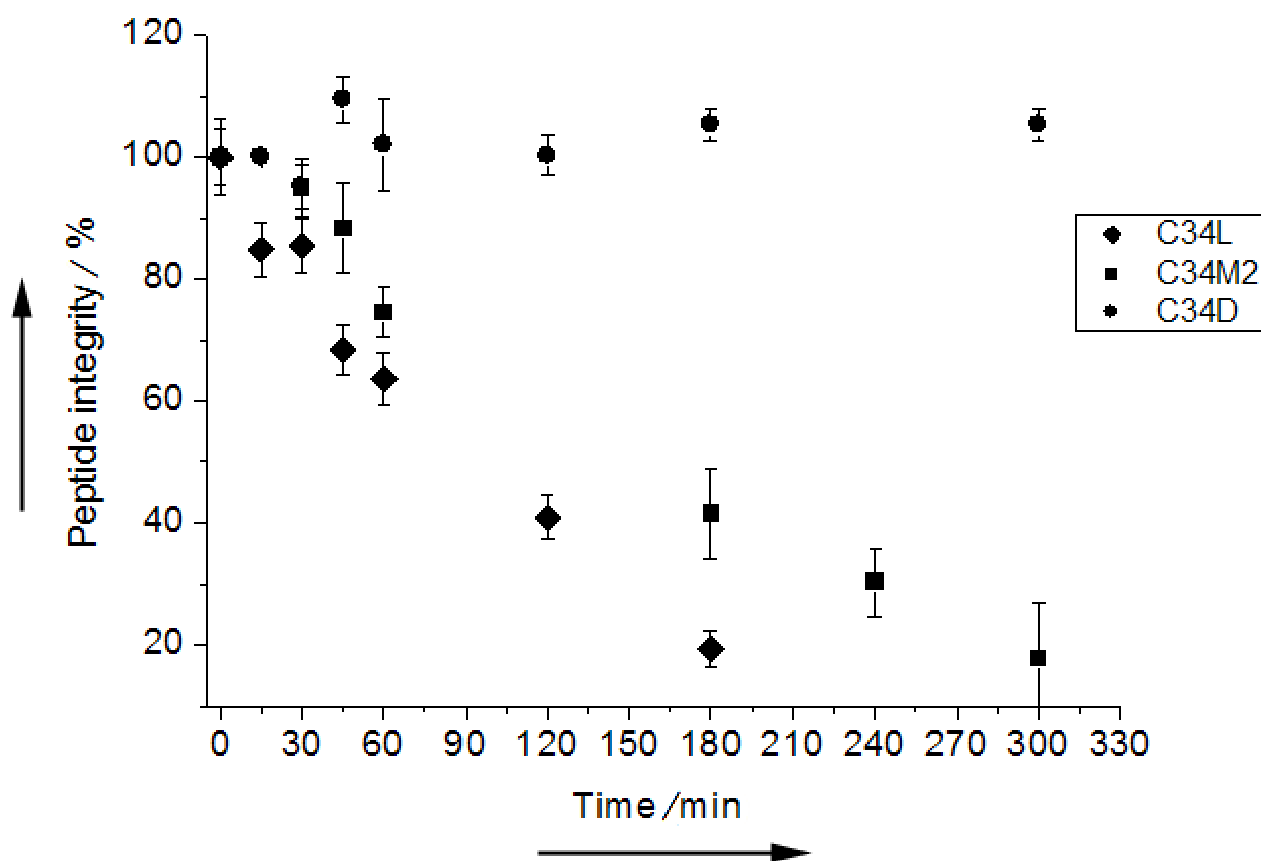


Figure 6 Kinetics of peptide degradation by chymotrypsin of C34L, C34M2, C34M3 and C34D peptides:

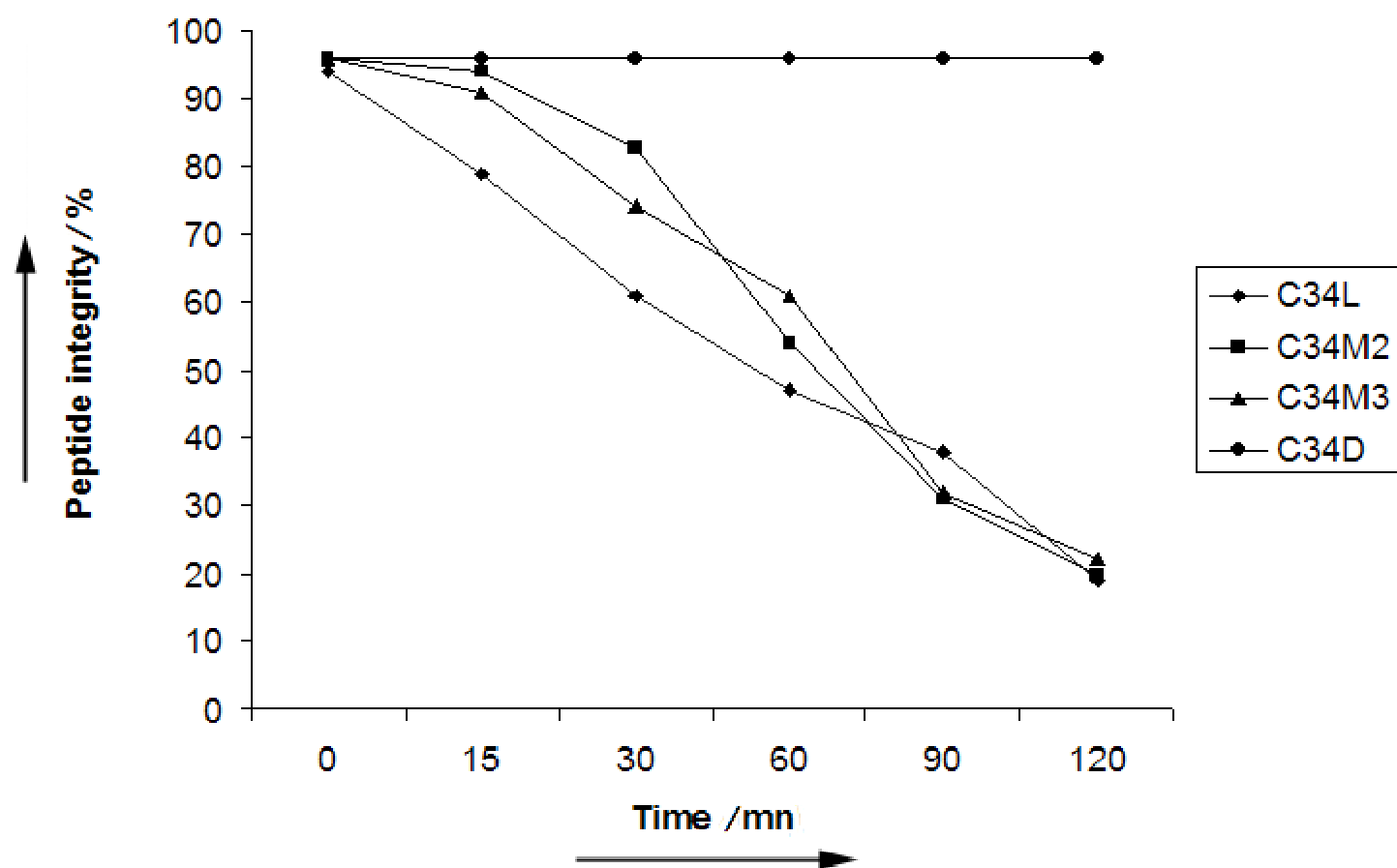


Figure 7 Inhibition of syncytium formation in the presence of C34L peptide and its analogues

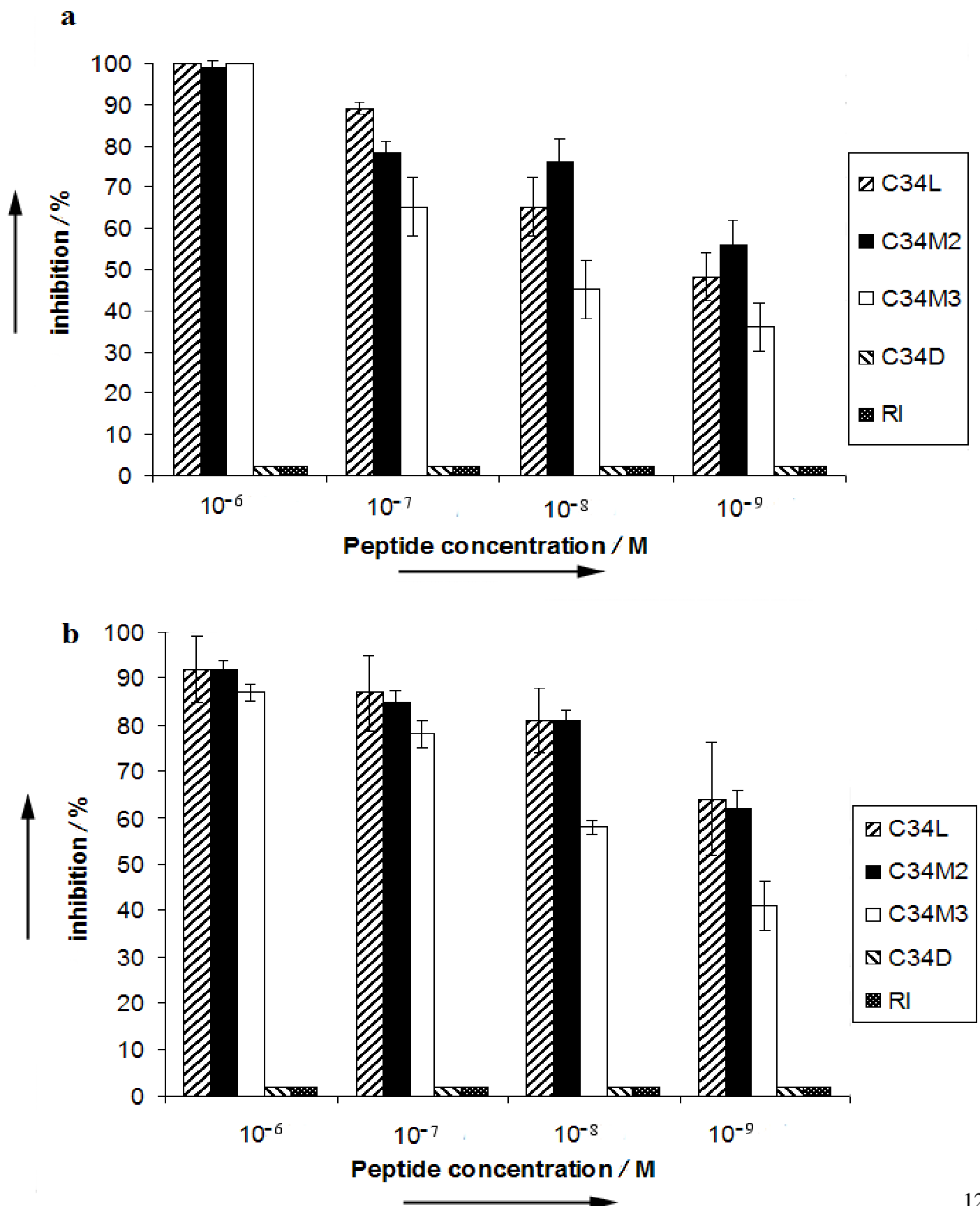


Figure 8 Anti-HIV-1 activity of C34L and its analogues in a single infectivity assay

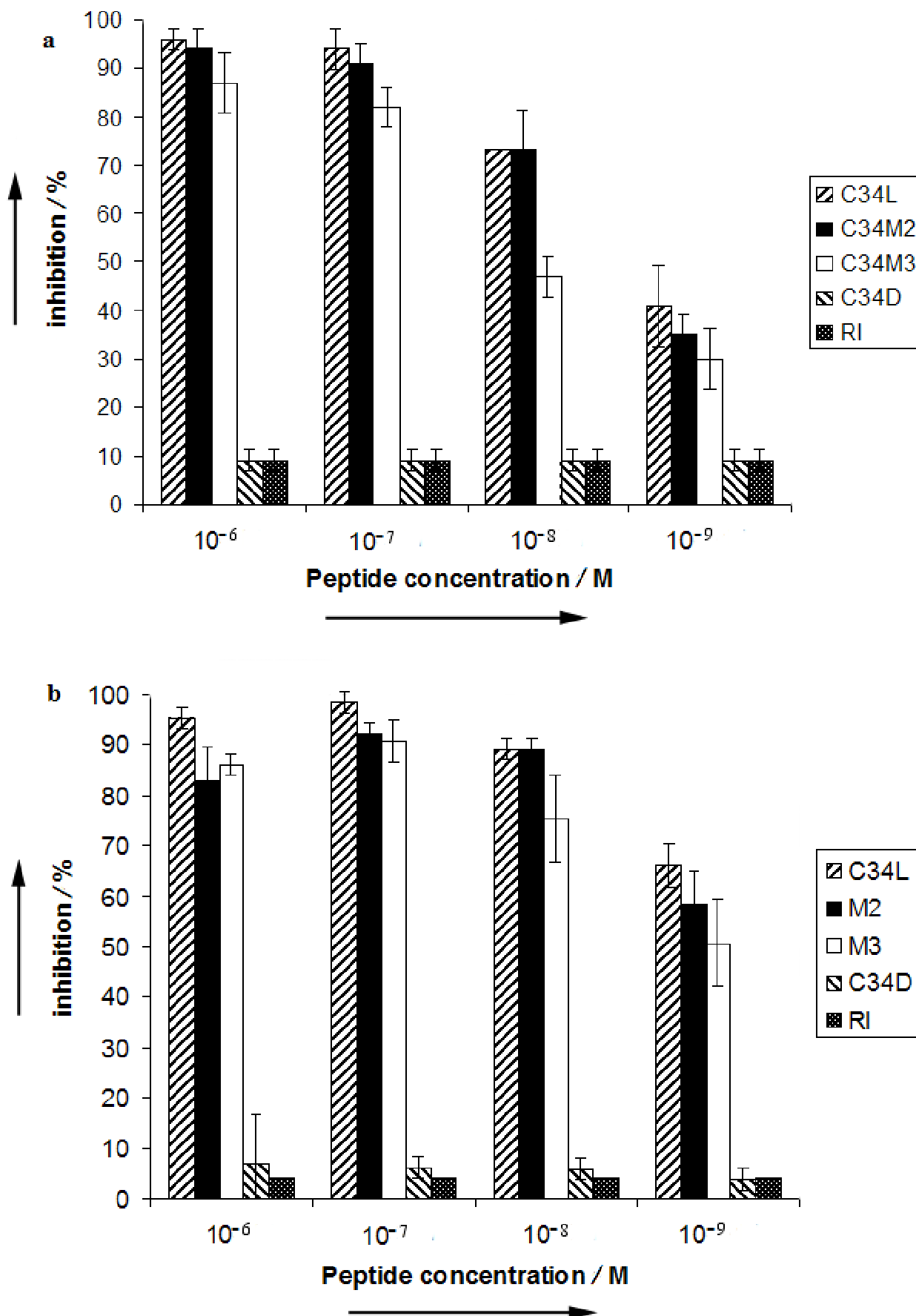
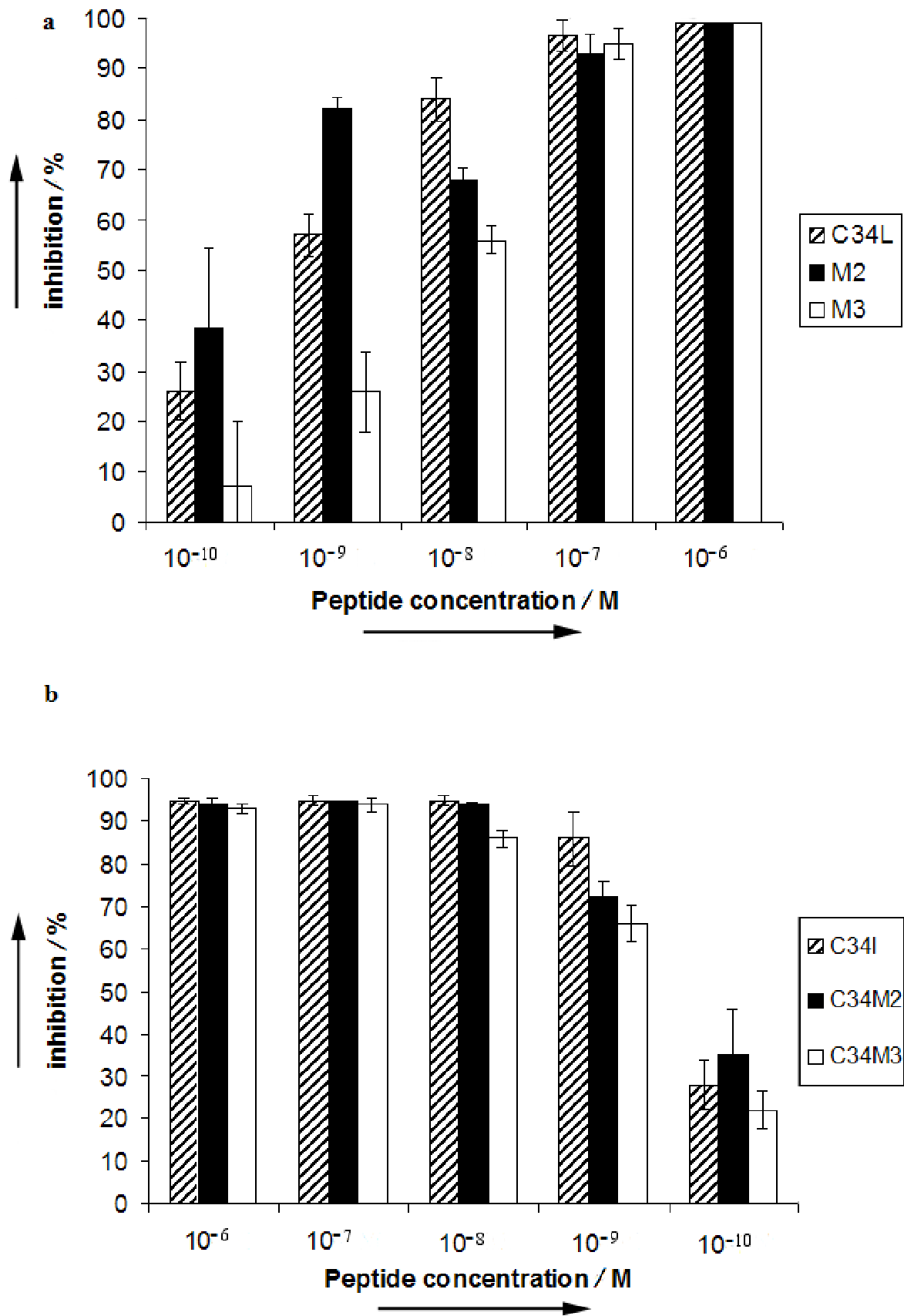


Figure 9 Effect of the C34L peptide and its analogues on viral replication of X4 and R5 tropic viruses



Article 2

manuscript

Antibodies against HIV-1 gp41 HRII peptides down modulate the direct inhibitory effect of these peptides

GASTON Fabrice*, GRANADOS Giovana †, MADURGA Sergio †, GIRALT Ernest †, and
BAHRAOUI Elmostafa*

Soumis: Journal of peptide science

Résumé de l'article

L'interaction entre les domaines HRI et HRII de la glycoprotéine gp41 du VIH représente une étape clé dans le mécanisme d'entrée du virus. Dans le but de développer des inhibiteurs spécifiques contre ces régions, des peptides synthétiques mimant ces domaines ont été synthétisés. Le peptide N36 correspondant au domaine HRI et le peptide C34, constitué d'acides aminés de type L ou D, correspondant au domaine HRII, ont été testés pour leur capacité à inhiber la réplication virale et à induire la production d'anticorps neutralisants. Les résultats montrent que les deux peptides adoptent une configuration en hélice α et peuvent interagir l'un avec l'autre pour former un complexe N36-C34. Le peptide C34L, contrairement au peptide C34D, présente une activité antivirale de l'ordre du nM. Cependant, cette activité antivirale est inhibée lorsque ce peptide est testé en présence des anticorps anti-C34L. Ces résultats soulignent l'effet négatif de la réponse humorale lors de l'utilisation de ces peptides comme médicament contre le virus. Ils soulignent également la nécessité de trouver d'autres moyens d'administration de ces peptides afin de diminuer leur immunogénicité.

Antibodies against HIV-1 gp41 HRII peptides down modulate the direct inhibitory effect of these peptides.

GASTON F.* , GRANADOS G. † , MADURGA S. † , GIRALT E . † , and BAHRAOUI E.*

**Laboratoire d'immuno-virologie, Université Paul Sabatier, UFR/SVT, 31062 Toulouse, France, †Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona, Parc Científic de Barcelona C/Josep Samitier 1-5 08028 Barcelona, SPAIN*

ABSTRACT

The interaction of the HRI and HRII domains of gp41 transmembrane glycoprotein represents a key step in the mechanism of HIV-1 entry by fusion. In order to develop specific inhibitors targeting this step, synthetic peptides mimicking these regions were evaluated. HRI and HRII regions were mimicked by N36 and C34 peptides respectively. These peptides were assembled with L or D amino acids. In addition to the L assembled C34 peptide, the retro and retro-inverso (RI) analogues were also synthesised and tested for their antiviral activity, immunogenicity and antigenicity. Our data showed that all the peptides, but the RI, are able to adopt α helical structure but only the C34L peptide was able to interact with the N36 peptide. At an immunological level, we showed that L assembled peptides are more immunogenic than D peptides in mice and do not present any cross antigenicity with D aa assembled peptides. Only the antibodies produced against C34L peptide can recognize the native HIV-1 envelope glycoprotein. But, in contrast to the C34L peptide which can inhibit HIV-1 replication at nM range, no neutralizing activity was observed with its specific antipeptide antibodies. Further, when these antibodies were added simultaneously with C34L peptide, the antiviral effect of C34L peptide became completely annealed. These data underline the potential negative effect of the humoral antipeptide response which can operate in enfuvirtide treated HIV-1 infected patients. Such antibody response may neutralize the antiviral effect of enfuvirtide by forming stable antigen-antibody complexes. To attenuate such effect, a new delivery protocol must be developed in order to limit formation of peptide-antipeptide complexes in the plasma of HIV-1 infected patients.

INTRODUCTION

The human immunodeficiency virus (HIV-1) belongs to the lentivirinae subfamily and retroviridae family, it infects preferentially CD4+ cells including lymphocytes, monocytes and macrophages(12, 26). Despite the dramatic effects of HIV-1 on host immunity, infected patients develop both humoral and cellular immune responses against HIV-1. Some studies have described a direct relation between progressive disease and the presence of neutralizing CTL or antibody against HIV(18, 28). Envelope glycoproteins are the major targets for antibody neutralization and several epitope on gp120 and gp41 have shown the ability to generate neutralizing antibodies(33, 34).

The struggle against HIV-1 is focalized on two ways, vaccination and anti-HIV drug therapy. Development of an efficient vaccine is limited principally by the high variability associated to HIV-1 replication (4). Although, it is possible to induce neutralizing anti-HIV-1 response with some anti-HIV-1 vaccine candidates. This response remained unable to prevent infection, but can control efficiently the viral load during primo infection and thus to prevent rapid AIDS development as clearly shown in VIS and SHIV/maaque animal models. But this neutralizing activity is only transient as shown by the escape of the virus and the apparition of virus resistances carrying selective mutations at the level of CTL epitope of neutralization.

In general, HIV-1 infected patients were firstly treated by drugs targeting reverse transcriptase and viral proteases in the “tritherapy”. After the emergence of virus with resistance to these drugs, patients received enfuvirtide™ which corresponds to a 36 amino acids peptide also named T-20 or DP178 (25).

The molecular mechanism of HIV-1 viral entry by membrane fusion is more understood now. The ectodomain of gp41 plays a crucial role in the fusion. This domain contains an hydrophobic fusion peptide sequence at its N terminal part and two hydrophobic heptad repeats (HRI and HRII) at its C terminal region(3, 5). After binding of gp120 to CD4 and subsequently to the coreceptor, further conformational changes occur leading to gp120-gp41 dissociation. The gp41 displays then its N-terminal hydrophobic region, corresponding to the fusion domain, which interacts with the host cell membrane(2, 15). Insertion of the the fusion domain into the host cell membrane leads the gp41 to fold into hairpin-like structure where the two hydrophobic heptad repeat (HRI and HRII) lie in an antiparallel orientation,

forming a 6 helix bundle(29, 40). This hairpin structure is believed to be responsible for the fusion of HIV envelope with the host cell membrane.

Understanding the mechanism of fusion of the viral envelope with the host membrane played a crucial role in the development of new generation of peptidic anti-retroviral drugs able to interfere with virus entry by blocking virus-cell fusion. Enfuvirtide™, a 36 L amino acids, is based on the sequence of HRII region. It binds to the triple-stranded coiled coil formed by the three HRI domains, thereby preventing HRI-HRII interaction and the formation of the six-helix bundle and hence inhibiting membrane fusion(7). Thus, T-20 peptide seems to mediate its inhibitory action by binding to a transient envelope conformation induced by gp120-CD4-CCR5/CXCR4 binding(17, 23, 32). In the initial stages of the use of T-20, this molecule inhibits efficiently HIV-1 replication in various cell types and clinical trials(31). Because of its limited half-life, an efficient treatment with this peptide necessitates the subcutaneous injection of great amount (90-100 mg) twice a day (25). Although the efficiency of this treatment is proved, such treatment remained very heavy to support by patients, in addition to the side reactions observed at the site of injection like palpable nodules (1, 35).

Several studies have reported the presence in HIV-1 infected patients of antibodies against HRI-HRII complex. In addition, antipeptide antibodies were generated in patients treated with T-20 (39). Despite the presence of ELDKWA which corresponds to the epitope recognized by the broadly neutralizing antibody 2F5, antibodies generated against T-20 in HIV-1 infected patients are not neutralizing. In addition it was reported that HRI sequence is not immunogenic in vivo (16, 20).

We suggest that the presence of such antibodies in the HIV-1 infected patients may act negatively on the efficiency of the antiviral effect of the peptide by forming stable antigen-antibody complexes.

MATERIAL AND METHODS

Peptide synthesis

Four peptides were synthesized and used in this study (table 1).

The peptide sequences tested were derived from HIV-1 Lai and correspond to the C-terminal heptad repeat HR1 and HR2 also named N36 and C34 respectively. The peptides were automatically synthesized in parallel on 330 mg of Rink amide-Gly-MBHA resin with low loading (0.3 mmol/g) on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer by using Fmoc chemistry. The MBHA resin HL (loading: 0.77 mmol/g, Novabiochem) was solvated

by successive washing steps with DCM (3x 1min), 10% TFA in DCM (1x10 min), 1% DIEA (3x 1min), DCM (3x1min) and DMF (3x1). Fmoc-Gly-OH (0.1 mmol) pre-activate with TBTU/HOBt/DIEA (1:1:1.5) in DMF was coupled. After 2 hours the resin was washed with DMF (3x1min) and DCM (3x1) and the free amino groups were capped with acetic anhydride/DIEA/DMF (3:1:16) (2x30min). The resin was washed with DMF (3x1min) and the Fmoc group was removed with 50% piperidina/DMF (3x5 min). Rink amide linker was coupled after be pre-activated with TBTU/HOBt/DIEA (1:1:1.5) in DMF. Fmoc/tBu protected amino acids (Iris Biotech GmbH) were incorporated using standard procedures and TBTU/HOBt/DIEA as coupling agents. Fmoc group was removed by treatment with 22 % piperidine and 0.07% Triton® X-100 in DMF. After final deprotection, peptides were acetylated by anhydride acetic treatment (40 eq., 9 eq. of DIEA, DMF). Concomitant side-chain deprotection and cleavage was performed by treatment with 5 mL of a mixture of TFA/H₂O/triisopropylsilane /ethanedithiol (92:4:2:2 v/v/v/v) for at 0°C for 30 minutes and at room temperature for 1.5 hours. TFA was removed by evaporation and the crude was precipitated with tert-butyl methyl ether. The products were characterized by HPLC, amino acid analysis and MALDI-TOF mass spectrometry.

Circular dichroism analysis of peptides

The spectra were recorded on a JASCO J-810 spectropolarimeter with the CDF-426S Peltier unit using a quartz cuvette of 0.1 cm optical path length teflon stopper. The peptide were dissolved in buffer phosphates pH 7.4 (10 mM potassium phosphates, 50 mM potassium fluoride). Solutions of 56 µM of peptides were performed in aqueous buffer alone or in the presence of 30% of trifluoroethanol. All C34 peptide analogues were soluble in buffer at this concentration with the exception of C34L and C34D. The N36 peptide aggregated at concentration higher than 10 µM. The equimolar mixture of N36 and C34 analogues were previously dissolved in 100 mM ammonium carbonate pH 8.0, neutralized with 1M acetic acid and lyophilized. The dry samples were dissolved in buffer phosphates at pH 7.4 in order to obtain 10 µM homogeneous solutions.

The measurement were obtained between 190-260 nm with a data pitch of 0.2 nm, a band width of 1 nm, scanning speed of 20 nm/min for 3 accumulations. All spectra were corrected subtracting the buffer spectrum. The CD data were expressed as molar ellipticity [θ] (deg.cm².dmol⁻¹) calculated(21, 38):

$$[\theta] = \frac{\theta}{10Cl}$$

Where, θ is the ellipticity in mdegrees), C is the molar concentration and l is the path length of cell in cm.

Binding analysis by surface plasmon resonance biosensor (SPR)

Biosensor experiments were carried out with a BIAcore T100 instrument (BIAcore, Sweden). The N36 peptide was immobilized on a sensor CM5 chip (Serie S) modified with a glyoxylyl group at its N-terminus. The changes in mass concentrations following the binding with the analyte (C34L peptide and its analogues) produce a proportional change in the refraction index on the surface detected as a SPR signal presented in RU (response units).

Modification of the N36 peptide

The β -amino alcohol moiety of the N-terminal seryl residue was converted in solution into a COCHO group (glyoxylyl group) by treatment with sodium periodate to give COCHO-N36(19). Immobilization of OHCCO to carboxymethylated dextran modified sensor surfaces (Sensor Chip CM5, S series) was performed using the surface aldehyde coupling method in BIAcore T100 instrument with a running buffer of HBS EP plus (10 mM 4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulphonic acid (HEPES), 0.15 M sodium chloride, 3.0 mM EDTA, 0.05% Surfactant P20 to pH 7.4). The sensor Chip was cleaning with 50 mM NaOH for 1 minute using a flow rate of 5 μ L/min. The surface was activated with an injection of 30 μ L of 0.2 M EDC/0.5 M NHS in water. The activators reagents were mixed just before the injection. The activation was followed by injection of 35 μ L of 120 mM carbonylhydrazide in water. The remaining activated groups were blocked by injection of 1 M ethanolamine hydrochloride, pH 8.5.

The OHCCO-N36 was then immobilized to the carbonylhydrazide activated surface by injections of peptide solution (0.5 μ M in 10 mM acetate buffers pH 4.5) until the immobilization expected was obtained (120RU). The hydrazone bond formed was reduced with sodium cyanoborohydride (0.1 M in 100 mM acetate buffer pH 4.0) at a flow rate of 2 μ L/min. The cleaning and stability of the surface were tested by injection of pulses of 5 μ L of 20 mM hydrochloric acid, 50 mM of NaOH, 0.05% of SDS and 0.03% of triton x-100. The reference flow cell was simultaneously prepared without ligand immobilized.

Mice immunization

Twelve mice balb/c were merged in 3 groups of 4 mice. On day 0, 50 μ g of each peptide mixed with an equal volume of Freund's complete adjuvant, were injected intradermally to the mice. The procedure was repeated subcutaneously on day 30 and 60 by

injecting 25 µg of each peptide in the presence of Freund's incomplete adjuvant. Animals were bled for serum 10 days following each injection.

Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA)

The 96 wells of microtiter plate (nunc immunomodule) were coated either with 500 ng of each peptide or with 50 ng of HIV-1 recombinant gp 160 in 50 µl of PBS pH 7.4 and incubated during 2 h at 37 °C. After saturation with 200 µl of PBS supplemented with 5% milk for one hour at 37°C. Wells were washed with PBS 0.2% Tween and 50 µl of different anti-peptide antibodies dilutions were added and incubated for two hours at 37°C. After rinsing, 50 µl of anti-mouse IgG labeled with horseradish peroxidase at 1/1000 (Dako, Glostrup, Denmark) were added for one hour at 37°C. After further rinsing, 100µl of orthophenyldiamine (OPD) dissolved in phosphate citrate buffer at pH 5.0 activated by H₂O₂ was added as substrate. After 20 mn in dark at room temperature, color development was stopped by adding 25 µl of 4N sulfuric acid and the 460/600 nm absorbance ratio was determined.

For inhibition experiment, various peptides concentration (10^{-6} to 10^{-10}) were incubated for two hours at 37°C with a constant dilution of anti-peptide sera, and the mixture was added to wells precoated with peptides and then saturated. Further steps of the assay was the same as described (27).

Recombinant HIV-1 gp160 protein:

The HIV-1 gp160 recombinant protein was produced with recombinant vaccinia virus expressing the modified env gene (Transgene, Strasbourg, France). The potential cleavage site between gp120 and gp41 was mutated.

Cell lines

HeLaCD4-CCR5/CXCR4-LTR/β-gal cells, a gift from Dr. P. Charneau (Pasteur Institute, Paris, France), are HeLa cells stably expressing human CD4, human CCR5 or CXCR4 coreceptor and containing the *LacZ* gene under the control of the HIV-1 LTR promoter. HeLa-gp120/gp41Lai are HeLa cells stably expressing gp160 from HIV-1 Lai. They were grown in complete Dulbecco's modified eagle medium in the presence of geneticin (1 mg/ml) for HeLaCD4-LTR/β-gal or 1µM of methotrexate for HeLa-gp120/gp41Lai.

Isolation of monocytes and differentiation in macrophages

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) from the buffy coat of healthy HIV-negative donors were isolated in a ficoll density gradient (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden). The cells were then plated at a density of $5 \cdot 10^6$ cells/well in 24-well tissue culture plates and maintained at 37°C, 5% CO₂. After 45 min, non-adherent cells were removed and the remaining cells were washed three times with Hank's buffered salt solution and incubated in medium containing 90% Iscove modified Dulbecco's medium, 10% Fetal Calf Serum, 1% Macrophage Colony-Stimulating Factor and a 1% penicillin-streptomycin mixture. The medium was changed every 3 days. On day 7, differentiated macrophages were infected with HIV-1.

Assay for the inhibition of syncytium formation

In this assay, the capacity of each anti-peptide antibodies, peptide, or the mixture of both to inhibit syncytium formation between HeLa CD4/CCR5 or HeLa CD4/CXCR4 and HeLa gp120/gp41 Lai or HeLa gp120/gp41 ADA was evaluated. This assay presents the advantage to test the capacity of HIV-1 envelope glycoprotein from X4 or R5 tropic virus without using infectious viral particles. To this end, 10^4 HeLa CD4/CCR5-CXCR4 were cocultured with 10^4 HeLa gp120/gp41 Lai-ADA and different dilutions of anti-peptide sera or various amount of peptides. Similar assays were performed with the mixture of their peptide and their specific antibodies. After 20 hours of culture at 37°C, the number of syncytia was scored under optical microscopy.

β-gal infectivity assay

HeLaCD4-CCR5/CXCR4-LTR/β-gal cells were incubated with HIV-1BaL (0.3 ng) for 2 h at 37°C in 2% FCS medium in the presence of different amounts of peptides. Infected cells were then washed twice with FCS-free medium and cultured in the presence of peptides in 10% FCS. After 24h (one replication cycle), cells were washed twice with PBS (0.5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂), fixed with 0.5% glutaraldehyde for 10 min and washed twice with PBS. They were incubated for 3 h in a mixture (1 mg/ml X-Gal in PBS) containing potassium ferricyanide (5 mM), potassium ferrocyanide (5 mM) and MgCl₂ (2 mM). The reaction was stopped by removing the X-Gal reaction solution.

Infectivity assays

Macrophages were isolated from buffy coat of healthy humans as described above. Cells were incubated with HIV-1BaL (0.3 ng) for 2 h at 37°C in 2% FCS medium in the presence of different amounts of peptides. Infected cells were then washed twice with FCS-free medium and cultured in the presence of peptides in 10% FCS. Every three days, the supernatant was harvested and tested for p24 (Innotest™ HIV Antigen mAB-INNOGENETICS)

RESULTS

Characterisation of C34L peptide:

Four peptides were synthesized using solid phase method with Fmoc strategy as described in material and methods. Peptide C34L corresponds to the HR2 domain 628-661 of HIV-1 LAI gp41, the C34D (retro) peptide is the enantiomer of C34L synthesised with all D amino acids and the RI corresponds to the retro-inverso analogue of the C34L peptide. The N36 peptide corresponds to the HRI domain 546-581. All the peptides were purified by HPLC chromatography on a C18 column and present an homogeneity of 98%. C34L presents a peak with a retention time at 13,512 min and a purity of 99,3% (figure 1a) and C34D presents a peak with a retention time at 11,915 min and a purity of 98,49% (figure 1b). The homogeneity of the peptides was confirmed by amino acid composition and molecular weight determination by MALDI-TOF (figure 1a and 1b). The RI and N36 peptides were obtained with similar characteristics (data not shown).

Structure of the peptide

To determine the structure of the C34L and its analogues, their circular dichroism spectra were performed in phosphate buffer containing 30% of trifluoroethanol (TFE). The TFE mimics the hydrophobic environment of the membrane and increases the propensity of alpha helix structure induction. As illustrated in figure 2a, the CD spectra of C34L peptide showed a spectrum with a double minimum at 208-222 nm and a positive band at 194 nm typical of an alpha helix structure. Interestingly, when the analysis was performed in the same condition with the C34D analogue peptide, the spectrum represents a mirror image of that

obtained with C34L (figure 2a). This difference is in agreement with the chirality of this two peptides.

HIV-1 enters in target cells after membranes fusion. This mechanism is mediated by the physical interactions between HR1 and HR2 domains mimicked by N36 and C34L peptides respectively. So, in order to evaluate the correct structure of our peptides, we tested their capacity to interact together and to form a defined structure. To this end, a mixture of equimolar concentration of C34L and N36 peptides was analysed in aqueous buffer by circular dichroism (figure 2b). While, when each peptide was analysed alone in aqueous buffer, no α -helix structure was observed. The analysis of the mixture clearly showed a spectrum characteristic of the presence of α -helix structure. More interesting, this result also indicates a direct interaction between N36 and C34 peptides. This interpretation is also in agreement with the antiviral activities of the peptides presented below.

Analysis of the interaction between N36 and C34L peptide by SPR

The profile of the different peptide sensograms clearly showed the capacity of C34L to interact with the N36 peptide. The model used is based on the concept that binding has a stoichiometry of 1/1 (36). To quantify the affinity of these interactions, the rate constants of association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) were measured from the sensogram by non linear fitting using BIA evaluation software (V4.1) (Biacore AB: Uppsala, Sweden, 2003). The k_{on} measured is $5.56 \cdot 10^2$ 1/Ms for C34L-N36 complex and $2.57 \cdot 10^2$ 1/Ms (figure 3a) In contrast to the expected data, the determined affinity of C34L-N36 complex is about $1.35 \cdot 10^{-5}$ M, corresponding to a moderate affinity. This weak affinity could be apparent and seems to be related to the nature of the solid phase assay used in this system. When the assay was performed in the same conditions with the C34D, only a weak interaction was observed as showed by the nature of the obtained sensograms. In addition, the complexes formed between C34D and N36 peptides can not be dissociated with the same buffer as with C34L. To observe few dissociation, a high salt concentration was needed. These results suggest a non specific interaction between C34D and N36. This interpretation is in accordance with the absence of antiviral activity of C34D (see below).

In addition, calculations of the docking of C34L or C34D peptides to the three helix presented in figure 3 showed the presence of a distorted shape in the C34D-N36 complex (figure 3c) while C34L seems to fit better with the structure formed with the three helices of N36 peptide (figure 3b).

Immunogenicity and antigenicity of C34L peptide and its analogs

Sera from mice immunized against C34L peptide and its analogues were titrated by ELISA against peptides and the envelope glycoprotein of HIV-1. Our results showed that C34L peptide is more immunogenic than peptides assembled with D amino acids (the retro and RI analogues) as showed in the experiments depicted in figure 4 which showe titer comparison. Interestingly, no cross antigenicity was observed between anti-C34L antibodies and the retro or retroinverso peptides (figure 5). This result underlines the high structural specificity of the antigen-antibody interaction.

In order to evaluate the capacity of these sera to recognize the native envelope glycoprotein of HIV-1, an ELISA test was performed by testing various dilutions of anti-peptide antibodies against gp160 previously coated in the in the wells. In this assay, only antibodies produced against C34L peptide are able to recognize the native envelope glycoprotein gp160 of HIV1. (figure 6)

Capacity of antipeptide antibodies to inhibit HIV-1 entry

The antiviral activity of antipeptide antibodies was tested for their capacity to block membrane fusion mediated by gp120/gp41-CD4-CCR5/CXCR4 interactions. In this assay, various dilutions of immune or preimmune sera from mice immunized against C34l, retro or RI peptides were incubated in a coculture of HeLa-CD4-CCR5/CXCR4 and HeLa-gp120/gp41 cells. In these assays, no syncytium inhibition was observed, indicating that, despite the presence of antibodies which recognize the native envelope glycoprotein, these antibodies are unable to neutralize cells membrane fusion mediated by gp120/gp41-CD4-CCR5/CXCR4 interactions.

However, when the experiments were performed with soluble C34L (10^{-6} - 10^{-10} M) instead of anti- C34L peptide antibodies, a high inhibition was observed (figure 7a) showing the capacity of these peptides to interfere with the mechanism leading to membrane fusion. The C34L peptide interfere with the molecular mechanism leading to membrane fusion by interacting with the HRI domain of the gp41 and thus prevents the formation of six-helix bundle between HRI and HRII.

In contrast, the retro and RI analogues are unable to inhibit syncytium formation (figure 7a). This latter result is in line with the incapacity of C34D to interact specifically with N36 as shown by circular dichroism and BIAcore analyses.

The same results were obtained when testing the antiviral activity of these peptides on the HIV-1 replication in HeLa-CD4-CCR5/CXCR4 cells 24 h post infection (figure 7b) or in the macrophage cells 3 days post infection (figure 7c), as described in material and methods.

Ability of these Antibodies to interfere with C34L antiviral activity:

Overall, our experiments showed that C34L peptide is able to inhibit HIV-1 entry while antipeptide produced against this peptide are not neutralizing. Thus we asked about the effect of the presence of these antibodies on the antiviral activity of C34L peptide. The objective of this experiment was to mimic the situation of patients treated by peptide T-20. In fact, for these patients, anti-T-20 antibodies were generated following treatment with T-20.

To this end, the antiviral activity of C34L peptide was tested in the presence of various dilutions of antipeptide sera. Interestingly, in these conditions, the antiviral activity of the C34L was totally inhibited by antipeptide antibodies specific to C34L (figure 8). When the same experiments were performed with antibodies produced against the retro or RI peptide, C34L peptide conserved its antiviral activity (figure 8). This result is in accordance with the absence of cross antigenicity as showed in figure 5.

DISCUSSION

The short half-life of gp41 HR2-derived peptides (T-20) used in the therapy against HIV-1 replication is an important limitation and necessitates the injection of high amount of peptide (90-100 mg) twice a day. This peptide is immunogenic in HIV-1 infected patients. But, unfortunately, the generated antibodies were unable to neutralize HIV-1 infection (13) despite the fact that it contains ELDKWA sequence, which corresponds to the broadly neutralizing monoclonal antibody 2F5 (34). Similarly, it was shown that antibodies produced against peptides mimicking HRI and HRII domains were not neutralizing (13). In contrast, antibodies produced against the preformed HRI-HRII complexes seem to generate neutralizing antibodies (13).

In this study, we synthesized and characterized the immunogenicity and antiviral activities of C34L, the retro C34D and the RI peptides. After synthesis, the homogeneity of the peptides was analyzed by HPLC and MALDI-TOF. At a structural level, the ability of these peptides to form an alpha helix structure, which is essential for the antiviral activity, was analyzed by circular dichroism. The obtained results confirmed the ability of C34 to form an alpha helix structure when the spectrum was recorded in the presence of TFE. The C34D can also form an α -helix structure. Interestingly, the spectrum is symmetrical to that of C34L. This symmetry is related to the dextrorotary D amino acids of the C34D peptide. In aqueous buffer, neither C34L nor N36 peptide folded in a α -helical structure. In contrast, when the two peptides are mixed in an equimolar amount, they interact together to form an α -helical structure even in aqueous solution. This result indirectly indicates a physical interaction between C34L and N36 to form an α -helix complex mimicking probably the six helix bundle described during the mechanism of cell-virus membrane fusion.

The analysis of C34-N36 interactions by SPR clearly showed a physical interaction with a weak affinity ($k_d = 1.35 \cdot 10^{-5}$ M). This unexpected apparent k_d may be directly related to the nature of the solid phase used.

In fact, during natural infection, the complex formed in solution between N36 and C34 corresponds to a six-helix bundle (6) while in our assay the N36 fragment was covalently attached to the sensor surface. Thus, the high affinity between N36 and C34L peptides was probably dependent of the spacial distribution of the N36 molecule on the sensor. It is important to consider the the k_d value is apparent. Despite this discrepancy, this assay has the merit to allow us to demonstrate a direct interaction between N36 and C34L peptides.

The antiviral activity of C34 was measured for its capacity to inhibit membranes fusion and HIV-1 replication. The obtained results showed that C34L peptide inhibit efficiently HIV-1 replication with a concentration at a nanomolar range. In contrast, no antiviral activity was observed with C34D, even when used at micromolar level. This absence of antiviral activity can be explained by the inverted helix structure and its incompatibility to interact with the N36 domain. Similarly, no antiviral activity was observed with the RI analogue. This analogue was synthesized in order to compare the structural disadvantage induced by the introduction of D amino acids. This type of modification is accomplished by simply reversing the peptide sequence direction and inverting the chirality of each amino acid. Several studies have reported that retro-inverso peptides are topologically correlated with the parent peptide since the resulting side chain disposition is similar to the parent peptide, but

carbonyl and amine groups are interconverted from their positions. Unfortunately, this RI peptide does not retain antiviral activity. This absence of activity may be related to the importance of the helical structure. It has been reported that the folding of RI peptide may be hindered when the peptide contains helical segments (22). However, several studies have shown that, in some cases, RI peptides can retain their biological activity with increased stability as reported for enkephalin, glutathione, substance P, gastrin and atrial natriuretic peptide (9).

Subsequently, the effects of anti-C34L antibodies were evaluated for their neutralizing activities in the absence or presence of C34L peptides. No neutralizing activity of these antibodies was observed when tested for the inhibition of syncytium formation or HIV-1 replication. However, these antibodies, when they are present in the same time as C34L peptide, totally inhibit its antiviral activity.

The absence of the ELDKWA, which corresponds to an epitope of neutralization recognized by the human monoclonal antibody 2F5, may explain, in part, the absence of generation of neutralizing antibodies against C34L peptides in the sera. Although previous studies have reported that antibodies generated against peptides contains ELDKWA, sequence failed to neutralize HIV-1 replication (10).

This capacity of anti-peptide antibodies to interfere with C34L antiviral activity may have biological significance in the treatment of HIV-1 infected patients with HR2 derived peptide like enfuvirtide™ (T-20). In fact, several recent studies have shown that anti-T20 antibodies were present in the sera of treated patients (33). By interacting with T20 peptide, anti-enfuvirtide antibodies may contribute negatively in the efficiency of the antiviral treatment. This phenomenon represents a real limitation of the use of intrinsic immunogenic peptidic inhibitors against HIV-1 infection.

In the present study, we clearly demonstrate the potential implication of such phenomenon, as shown by the capacity of non neutralizing anti-C34L peptide to block the antiviral activity of the peptide by forming stable antigen-antibody complexes.

One strategy to attenuate this negative effect may be to include in an appropriate structure an epitope of neutralization as the conserved sequence ELDKWA present in T20 peptide. Thus, the generated anti-peptide antibodies may act cooperatively with the peptide in order to neutralize viral replication and to control viral load. More interestingly it has been observed that this type of antibodies did not induce emergence of replicative resistant HIV viruses. A second approach may be to act on the peptide delivery strategy. For example, peptides can be previously encapsulated in nanoparticles (as PLG) in order to attenuate the

negative effects of specific antibodies and the proteolytic effect of endogenous proteases (8, 11, 14, 24, 30, 37, 41).

REFERENCES

1. **Ball, R. A., and T. Kinchelov.** 2003. Injection site reactions with the HIV-1 fusion inhibitor enfuvirtide. *J Am Acad Dermatol* **49**:826-31.
2. **Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber.** 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**:657-700.
3. **Bernstein, H. B., S. P. Tucker, S. R. Kar, S. A. McPherson, D. T. McPherson, J. W. Dubay, J. Lebowitz, R. W. Compans, and E. Hunter.** 1995. Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41. *J Virol* **69**:2745-50.
4. **Boyer, J. C., K. Bebenek, and T. A. Kunkel.** 1992. Unequal human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase error rates with RNA and DNA templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6919-23.
5. **Chambers, P., C. R. Pringle, and A. J. Easton.** 1990. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J Gen Virol* **71 (Pt 12)**:3075-80.
6. **Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-73.
7. **Chen, C. H., T. J. Matthews, C. B. McDanal, D. P. Bolognesi, and M. L. Greenberg.** 1995. A molecular clasp in the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 TM protein determines the anti-HIV activity of gp41 derivatives: implication for viral fusion. *J Virol* **69**:3771-7.
8. **Choi, Y., S. Y. Kim, K. Park, J. Yang, K. J. Cho, H. J. Kwon, and Y. Byun.** 2006. Chemopreventive efficacy of all-trans-retinoic acid in biodegradable microspheres against epithelial cancers: results in a 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis model. *Int J Pharm* **320**:45-52.
9. **Chorev, M., and M. Goodman.** 1995. Recent developments in retro peptides and proteins--an ongoing topochemical exploration. *Trends Biotechnol* **13**:438-45.
10. **Coeffier, E., J. M. Clement, V. Cussac, N. Khodaei-Boorane, M. Jehanno, M. Rojas, A. Dridi, M. Latour, R. El Habib, F. Barre-Sinoussi, M. Hofnung, and C. Leclerc.** 2000. Antigenicity and immunogenicity of the HIV-1 gp41 epitope ELDKWA inserted into permissive sites of the MalE protein. *Vaccine* **19**:684-93.
11. **Cui, C., V. C. Stevens, and S. P. Schwendeman.** 2007. Injectable polymer microspheres enhance immunogenicity of a contraceptive peptide vaccine. *Vaccine* **25**:500-9.
12. **Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-7.
13. **de Rosny, E., R. Vassell, P. T. Wingfield, C. T. Wild, and C. D. Weiss.** 2001. Peptides corresponding to the heptad repeat motifs in the transmembrane protein (gp41) of human immunodeficiency virus type 1 elicit antibodies to receptor-activated conformations of the envelope glycoprotein. *J Virol* **75**:8859-63.
14. **Degim, I. T., and N. Celebi.** 2007. Controlled delivery of peptides and proteins. *Curr Pharm Des* **13**:99-117.

15. **Doms, R. W., and J. P. Moore.** 2000. HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J Cell Biol* **151**:F9-14.
16. **Earl, P. L., C. C. Broder, R. W. Doms, and B. Moss.** 1997. Epitope map of human immunodeficiency virus type 1 gp41 derived from 47 monoclonal antibodies produced by immunization with oligomeric envelope protein. *J Virol* **71**:2674-84.
17. **Gallo, S. A., A. Puri, and R. Blumenthal.** 2001. HIV-1 gp41 six-helix bundle formation occurs rapidly after the engagement of gp120 by CXCR4 in the HIV-1 Env-mediated fusion process. *Biochemistry* **40**:12231-6.
18. **Geffin, R. B., G. B. Scott, M. Melenwick, C. Hutto, S. Lai, L. J. Boots, P. M. McKenna, J. A. Kessler, 2nd, and A. J. Conley.** 1998. Association of antibody reactivity to ELDKWA, a glycoprotein 41 neutralization epitope, with disease progression in children perinatally infected with HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**:579-90.
19. **Geoghegan, K. F., and J. G. Stroh.** 1992. Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjug Chem* **3**:138-46.
20. **Golding, H., M. Zaitseva, E. de Rosny, L. R. King, J. Manischewitz, I. Sidorov, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, D. S. Dimitrov, and C. D. Weiss.** 2002. Dissection of human immunodeficiency virus type 1 entry with neutralizing antibodies to gp41 fusion intermediates. *J Virol* **76**:6780-90.
21. **Greenfield, N. J.** 2004. Analysis of circular dichroism data. *Methods Enzymol.* **383**:282-317.
22. **Guichard, G., S. Muller, M. van Regenmortel, J. P. Briand, P. Mascagni, and E. Giralt.** 1996. Structural limitations to antigenic mimicry achievable with retroinverso (all-D-retro) peptides. *Trends Biotechnol* **14**:44-5.
23. **He, Y., R. Vassell, M. Zaitseva, N. Nguyen, Z. Yang, Y. Weng, and C. D. Weiss.** 2003. Peptides trap the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein fusion intermediate at two sites. *J Virol* **77**:1666-71.
24. **Johnson, O. L., J. L. Cleland, H. J. Lee, M. Charnis, E. Duenas, W. Jaworowicz, D. Shepard, A. Shahzamani, A. J. Jones, and S. D. Putney.** 1996. A month-long effect from a single injection of microencapsulated human growth hormone. *Nat Med* **2**:795-9.
25. **Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag.** 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**:1302-7.
26. **Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**:767-8.
27. **Leghari, K., X. Contreras, C. Moureau, and E. Bahraoui.** 2008. HIV-1 Tat protein induces TNF-alpha and IL-10 production by human macrophages: Differential implication of PKC-betaII and -delta isozymes and MAP kinases ERK1/2 and p38. *Cell Immunol.*
28. **Loomis-Price, L. D., J. H. Cox, J. R. Mascola, T. C. VanCott, N. L. Michael, T. R. Fouts, R. R. Redfield, M. L. Robb, B. Wahren, H. W. Sheppard, and D. L. Birx.** 1998. Correlation between humoral responses to human immunodeficiency virus type 1 envelope and disease progression in early-stage infection. *J Infect Dis* **178**:1306-16.
29. **Lu, M., S. C. Blacklow, and P. S. Kim.** 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* **2**:1075-82.

30. **Malik, D. K., S. Baboota, A. Ahuja, S. Hasan, and J. Ali.** 2007. Recent advances in protein and peptide drug delivery systems. *Curr Drug Deliv* **4**:141-51.
31. **Matthews, T., M. Salgo, M. Greenberg, J. Chung, R. DeMasi, and D. Bolognesi.** 2004. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov* **3**:215-25.
32. **Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert, and F. S. Cohen.** 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* **151**:413-23.
33. **Miller, M. D., R. Geleziunas, E. Bianchi, S. Lennard, R. Hrin, H. Zhang, M. Lu, Z. An, P. Ingallinella, M. Finotto, M. Mattu, A. C. Finnefrock, D. Bramhill, J. Cook, D. M. Eckert, R. Hampton, M. Patel, S. Jarantow, J. Joyce, G. Ciliberto, R. Cortese, P. Lu, W. Strohl, W. Schleif, M. McElhaugh, S. Lane, C. Lloyd, D. Lowe, J. Osbourn, T. Vaughan, E. Emini, G. Barbato, P. S. Kim, D. J. Hazuda, J. W. Shiver, and A. Pessi.** 2005. A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:14759-64.
34. **Muster, T., F. Steindl, M. Purtscher, A. Trkola, A. Klima, G. Himmler, F. Ruker, and H. Katinger.** 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **67**:6642-7.
35. **Myers, S. A., A. A. Selim, M. A. McDaniel, R. Hall, Y. Zhang, J. A. Bartlett, and A. L. True.** 2006. A prospective clinical and pathological examination of injection site reactions with the HIV-1 fusion inhibitor enfuvirtide. *Antivir Ther* **11**:935-9.
36. **Myszka, D. G.** 2000. Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with BIACORE. *Methods Enzymol* **323**:325-40.
37. **Sinha, V. R., and A. Trehan.** 2003. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release* **90**:261-80.
38. **Sreerama, N., and R. W. Woody.** 2004. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol.* **383**:318-51.
39. **Vincent, N., J. C. Tardy, J. M. Livrozet, F. Lucht, A. Fresard, C. Genin, and E. Malvoisin.** 2005. Depletion in antibodies targeted to the HR2 region of HIV-1 glycoprotein gp41 in sera of HIV-1-seropositive patients treated with T20. *J Acquir Immune Defic Syndr* **38**:254-62.
40. **Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**:426-30.
41. **Yuan, X., L. Li, A. Rathinavelu, J. Hao, M. Narasimhan, M. He, V. Heitlage, L. Tam, S. Viqar, and M. Salehi.** 2006. SiRNA drug delivery by biodegradable polymeric nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* **6**:2821-8.

Table 1: peptides used

AcC34L ⁶²⁸WMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELL⁶⁶¹-NH₂

AcC34D ⁶²⁸wmewdreinnytslihsleesqnqqekneqell⁶⁶¹-NH₂*

RC34D ⁶²⁸lleqenkeqqnqseeilshilstynnierdwemw⁶⁶¹-NH₂ *

N36 ⁵⁴⁶SGIVQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL⁵⁸¹

* all-D amino acids,

Figure 1

HPLC and MALDI-TOF analyses of C34L and C34D peptides.

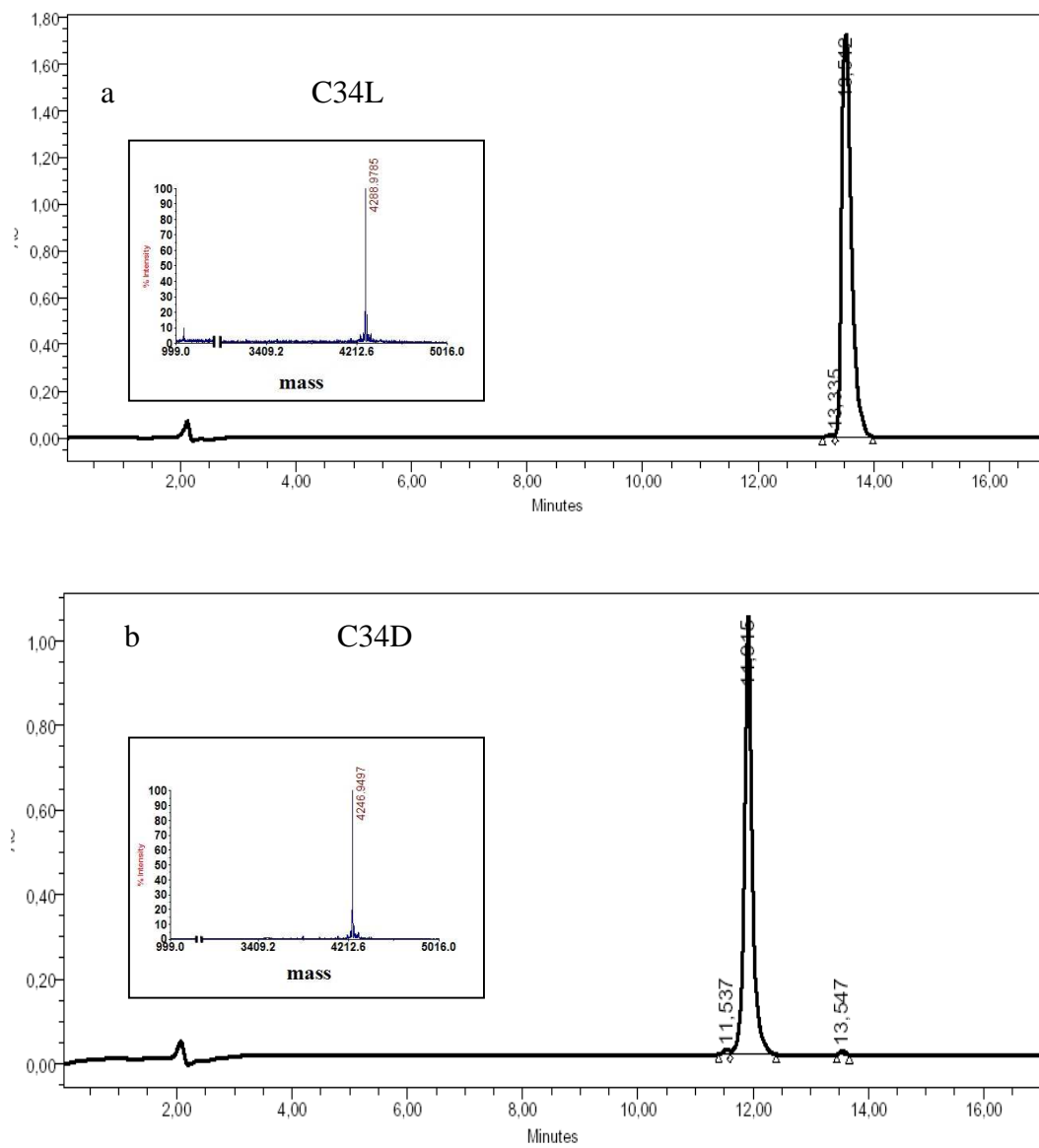


Figure 2a

Circular dichroism spectra of C34L and C34D peptides.

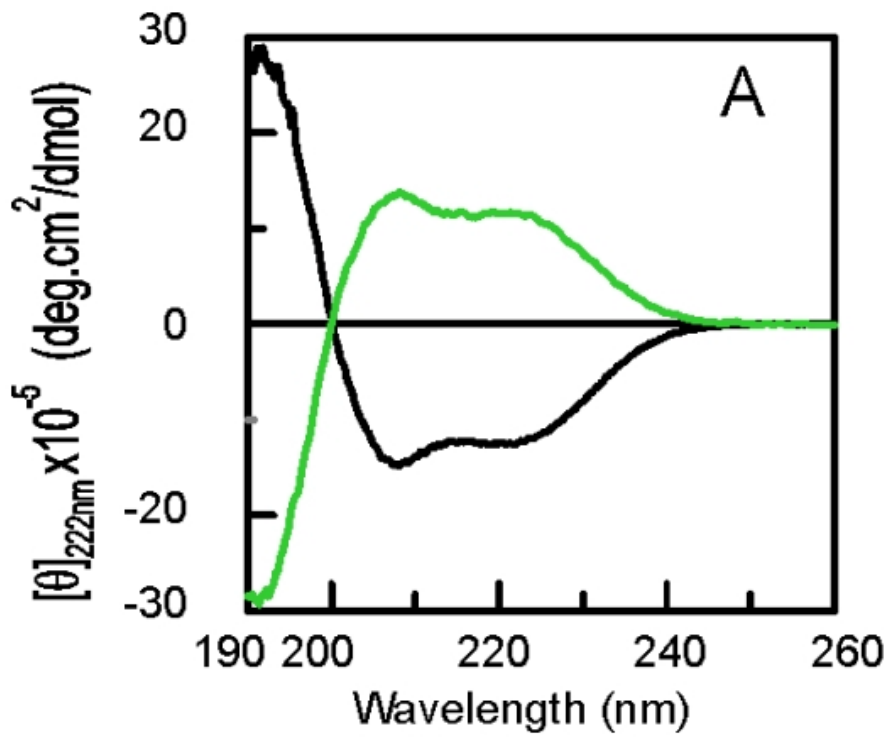


Figure 2b

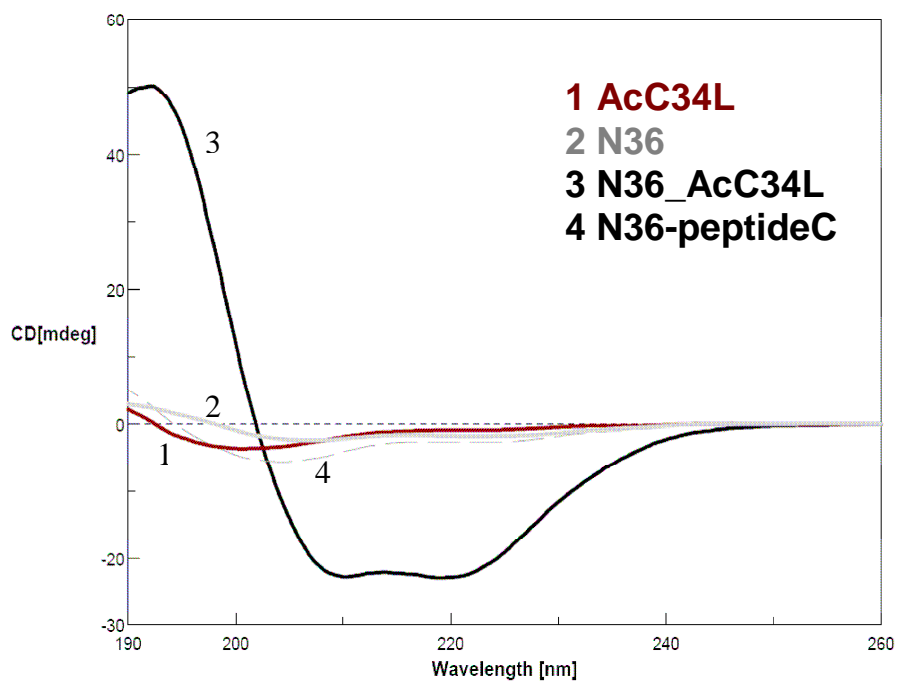


Figure 3

Study of C34L-N36 interaction

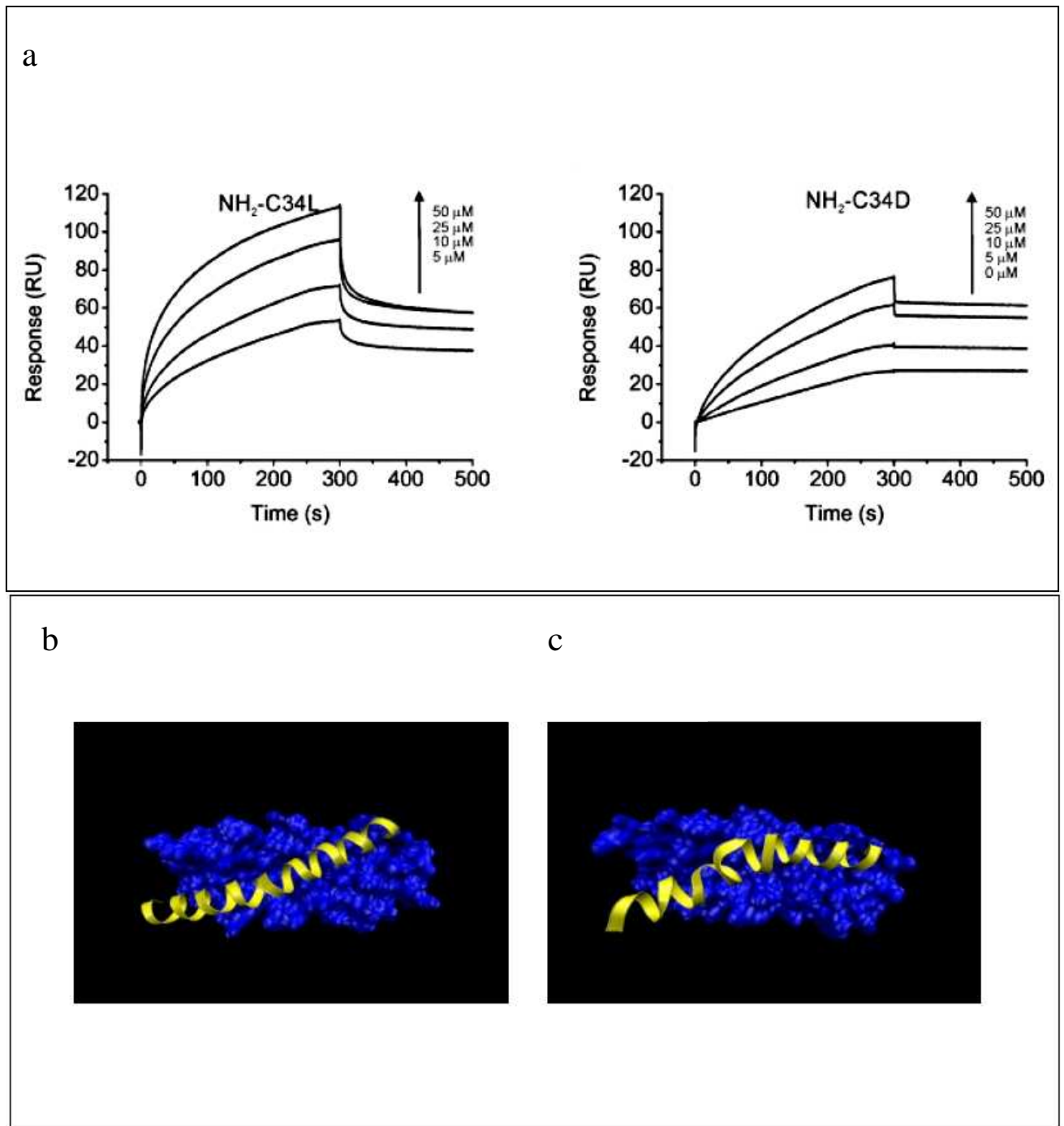


Figure 4 Titration of sera from mice immunized with the different peptides after each injection

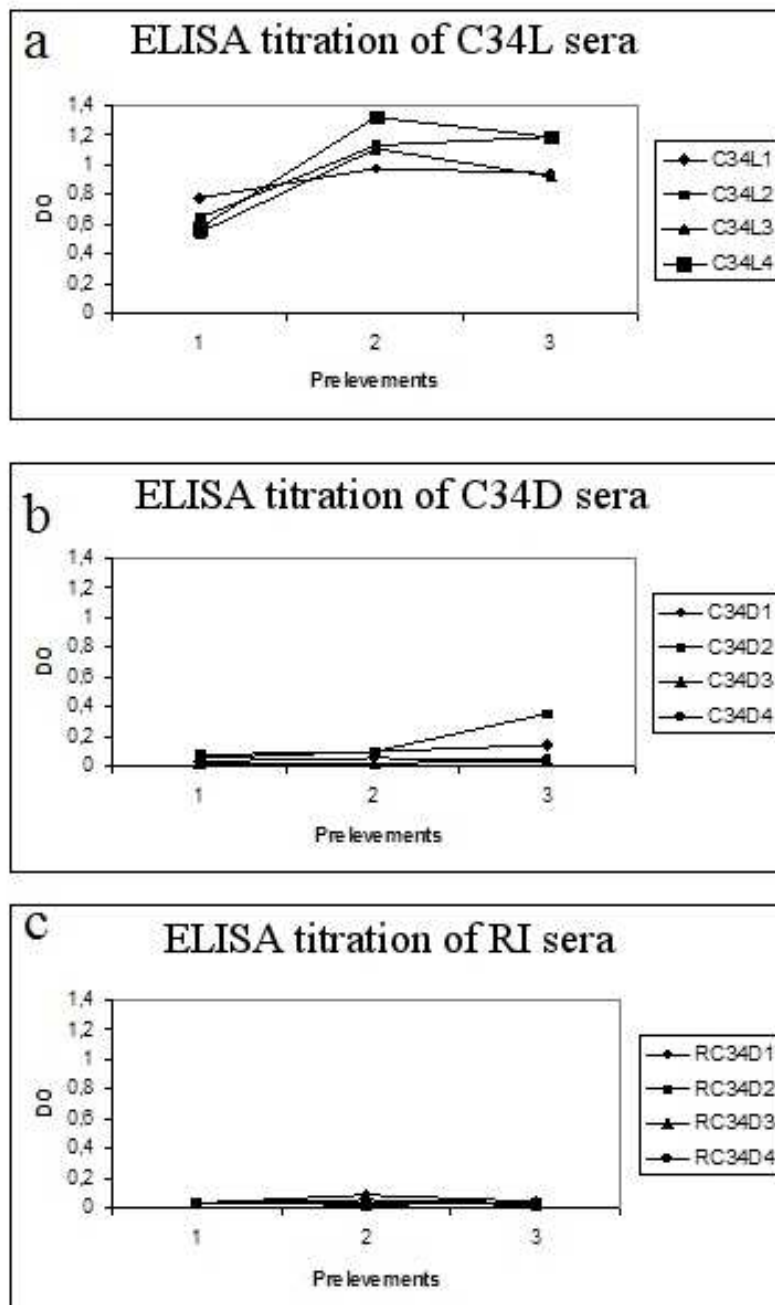


Figure 5

Activity of C34L sera against C34D and RI peptides

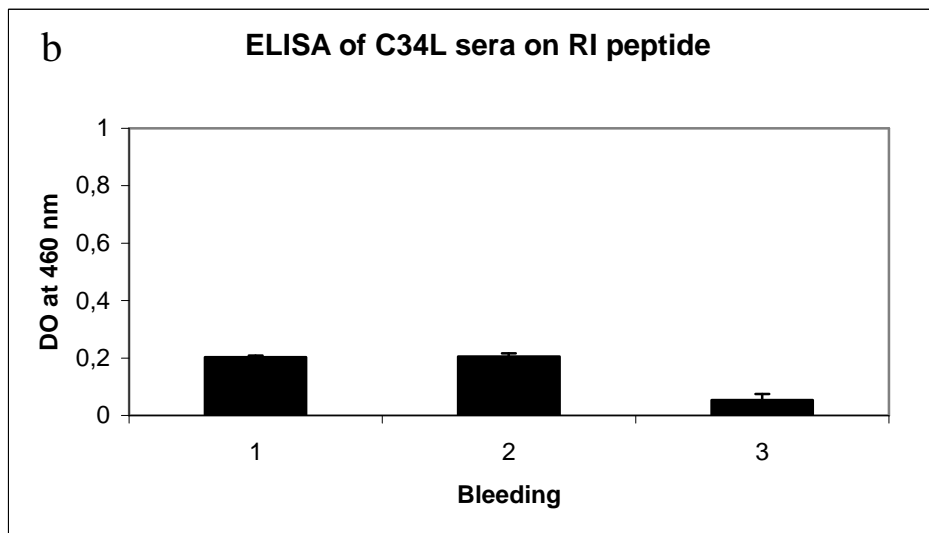
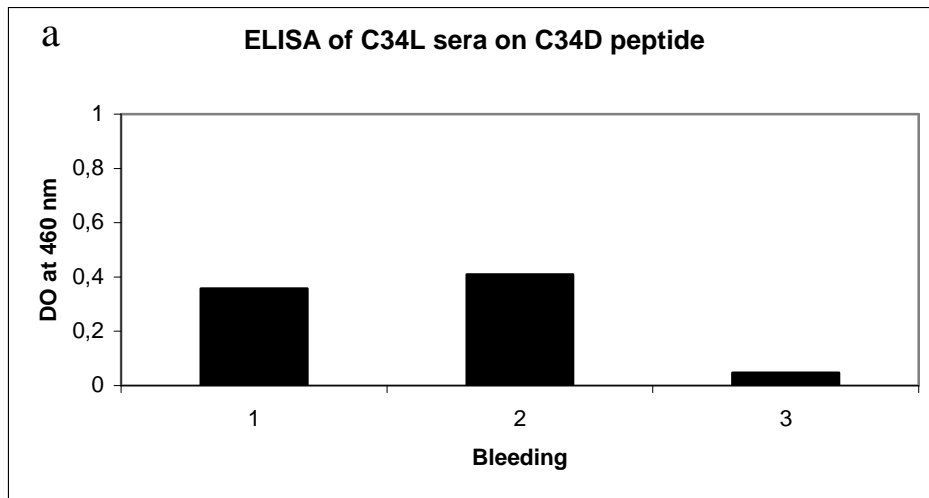


Figure 6

Activity of sera against native gp160

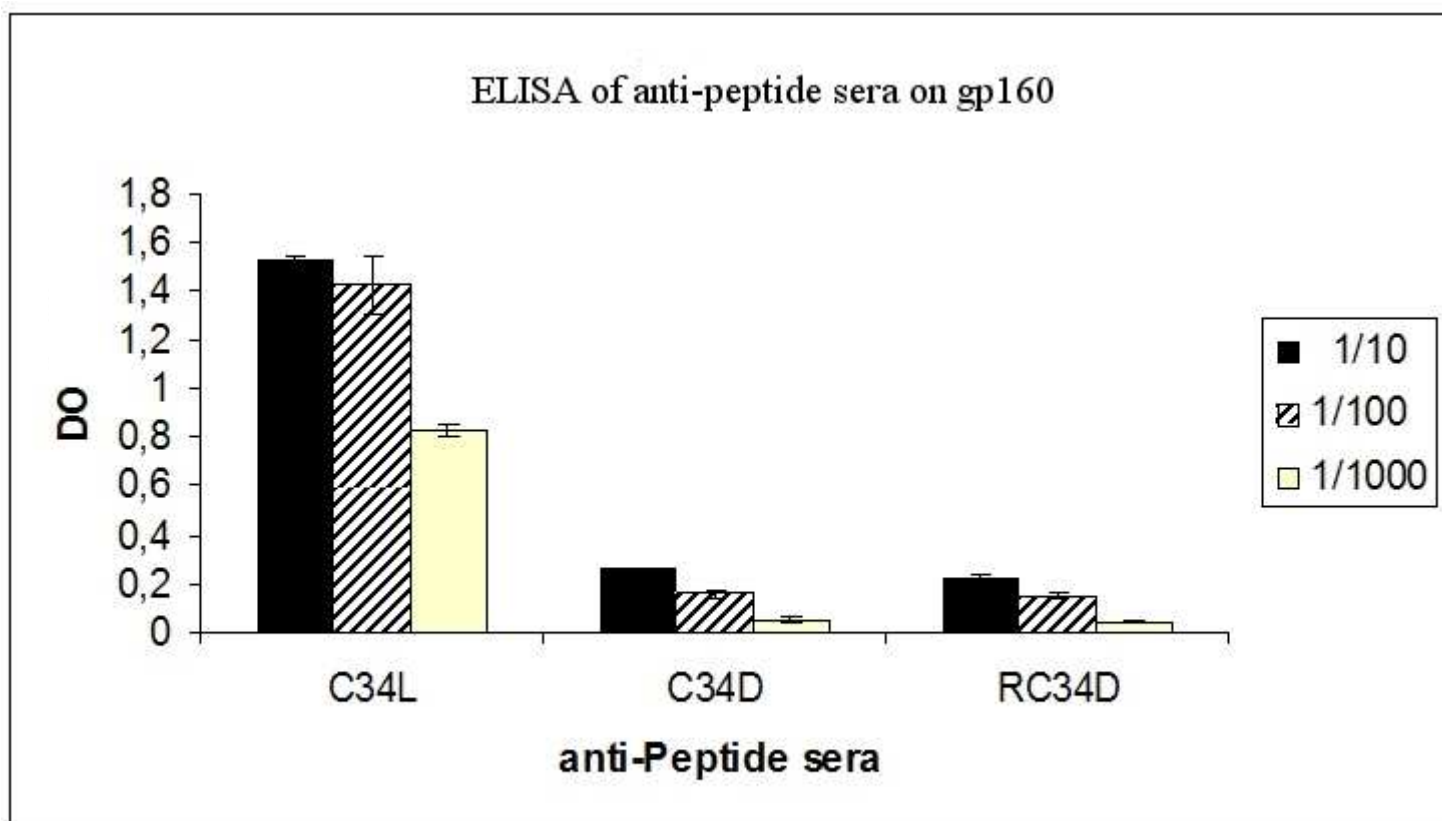


Figure 7

Antiviral activities of C34L and C34D peptides

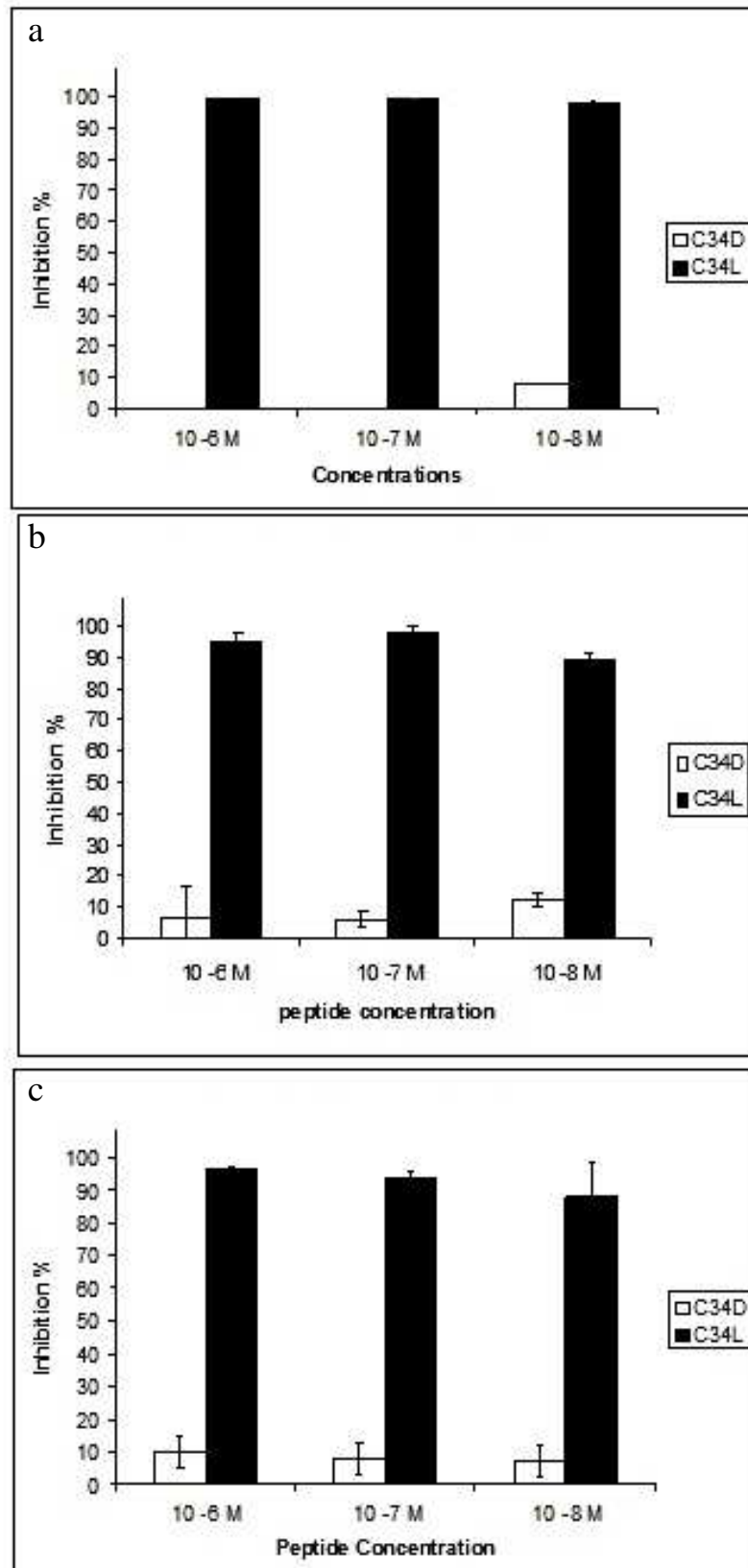


Figure 8

Interference between activity of peptides and anti-peptide sera

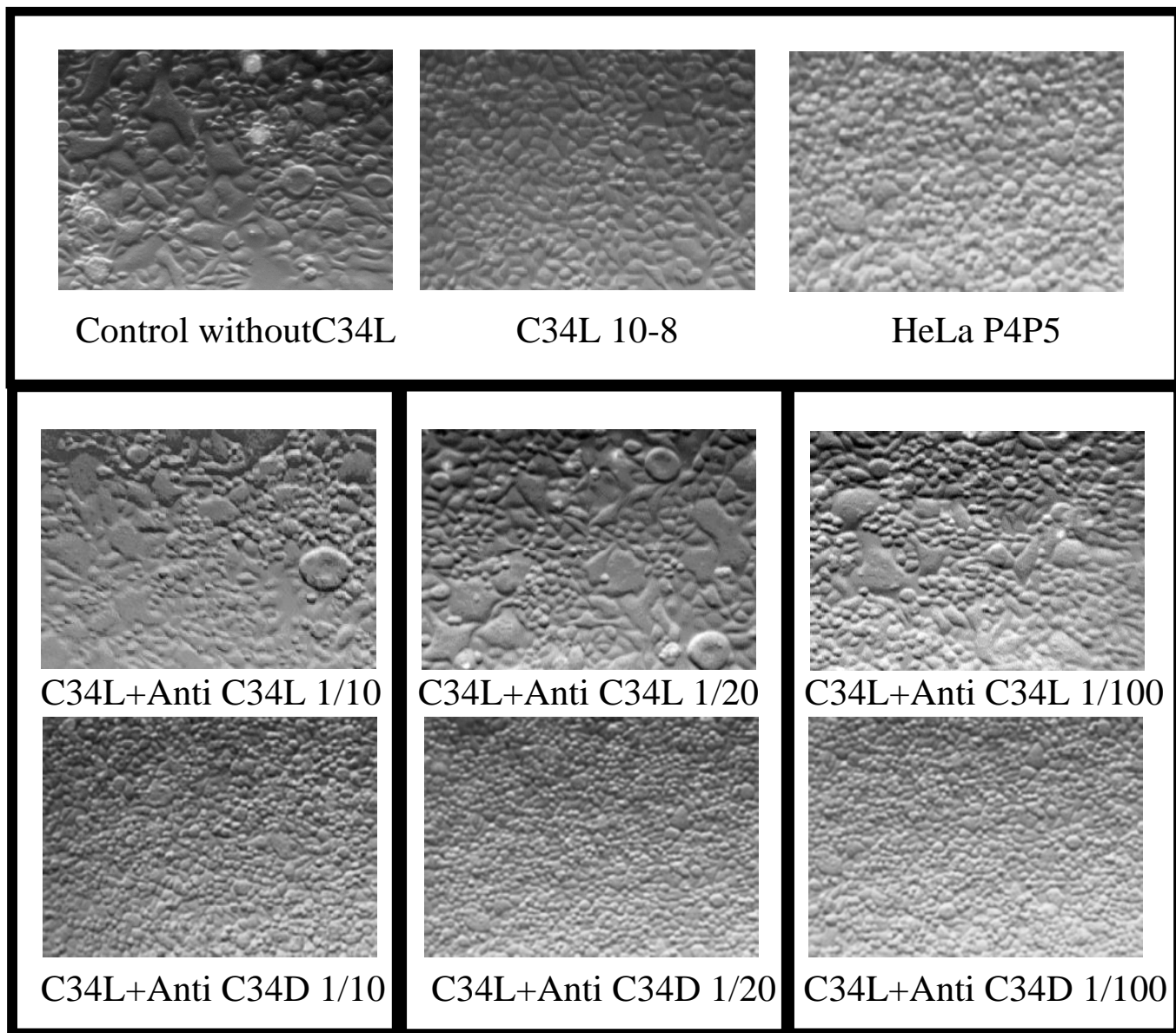


Figure 1: Characterization of the homogeneity of C34L (a) and C34D (b) peptides by analytical RP-HPLC and MALDI-TOF (small window).

Figure 2: a. Circular dichroism spectra of C34L and C34D peptides in 30% of TFE. b. Circular dichroism spectra of an equimolar mixture of N36 with C34L or C34D peptides in aqueous solution

Figure 3: Study of C34L-N36 interaction.

a) Sensograms for the binding between N36 and C-peptides: NH₂-C34L (1), NH₂-C34D (2). Interaction studies were performed with 160 RU of immobilized OHCCO-N36 on a Chip CM5 (Serie S). C-peptides were injected at the concentrations indicated in the top-right side of each sensogram set. The samples were injected for 300 s and the dissociations were monitored for at least 200 s. The binding was monitored in 10mM sodium phosphate buffer and 0.5M NaCl at a flow rate of 30 μ L/min and 25°C.A. To determinate the binding of C34 was used the analogue peptide with the N-terminal group free because the intrinsic insolubility of C34 acetylated. b)3D representation of interaction of C34L or C34D (c) with a model of a trimer of N36 peptides. A monomere of each C34 peptides is represented in yellow. The trimer of N36 is presented in blue.

Figure 4: Titration of sera from mice immunized with the different peptides. Mice were bled 10 days after each injection and the corresponding sera tested in a comparative assay. The sera of mice immunized with each peptide diluted at 1/100 is tested by ELISA).a. C34L sera, b. C34D sera, C. RI sera.

Figure 5:Cross antigenicity of C34L sera against C34D and RI peptides. Sera from mice immunized with C34L peptides were tested by ELISA against C34D and RI peptides .

Figure 6:Immunoreactivity of anti-peptide antibodies against native envelope glycoprotein from HIV-1 gp160. Sera from mice immunized with C34L, C34D, an RI peptides were tested by ELISA against native HIV-1 gp160 previously coated on the wells.

Figure 7: Antiviral activity of C34L, C34D and RI peptides tested by analyzing the capacity of the peptides to: a).inhibit syncytia formation, in a coculture between HeLa-cells expressing stably HIV-1gp120/gp41 and HeLa cells expressing stably-CD4-CCR5/CXCR4 , b). inhibit HIV-1 replication in a one replicative HIV-1 viral cycle assay, HeLa-CD4-CCR5/CXCR4 also stably transfected by LTR-lacZ plasmids were infected by CCR5 or CXCR4 tropic HIV-1 in the presence of various concentrations of C34L peptide and its analogues and the β gal activity was measured 24 h post infection as described in M&M.c)to inhibit HIV-1 replication in primary cells, in this assay primary macrophages derived from monocytes were infected by a CCR5 tropic virus in the presence of different amount of peptides, and HIV-1 replication was evaluated 3 days post infection by p24 ELISA test.

Figure 8: Effect of anti-peptide antibodies on their capacities to inhibit syncytia formation. In this assay , C34L peptide and its analogues were tested for their capacities to inhibit syncytia formation in the same conditions as in figure 7a, except that anti-peptide antibodies

were added simultaneously with peptides. 100% inhibition of syncytia formation was performed with C34L peptide used at 10^{-8} M and positive control was performed in the absence of peptides or anti-peptide antibodies.

Article 3

manuscript

Antigenicity and immunogenicity of V3 region of SIVmac envelope glycoprotein: Effect of the linear and circular structure on the generation of neutralizing antibodies

GASTON F.*, BABAS T., LAKHDAR-GHAZAL F.*, BAHRAOUI E.*

Soumis : Molecular Immunology

Résumé de l'article

L'objectif de cette étude consiste à analyser l'immunogénicité et l'antigénicité du domaine V3 (Cystéine 313-Cystéine 346) de la glycoprotéine d'enveloppe gp125 de SIVmac251. Le peptide correspondant à ce domaine a été synthétisé sous forme linéaire et cyclique et caractérisé pour ses propriétés immunogènes. Nos résultats montrent que, tout comme pour le VIH, cette région contient un épitope immunodominant. L'antigénicité des deux peptides est comparable lorsqu'ils sont testés contre un ensemble de 15 sera provenant de macaques infectés par SIV. L'immunogénicité de ces peptides est également similaire pour les deux types de peptide. En effet, les anticorps produits contre les formes linéaires et cycliques ont une réactivité similaire contre les deux structures de V3. Cependant, contrairement à nos attentes, les anticorps produits contre le peptide linéaire reconnaissent mieux la glycoprotéine native que les anticorps produits contre le peptide cyclique. De plus, nous avons montré que les anticorps anti-peptides reconnaissent mieux la glycoprotéine déglycosylée, ce qui souligne l'importance du site de N-glycosylation au niveau de l'asparagine 318. Contrairement aux anticorps anti-V3 de VIH-1, les anticorps produits contre la boucle V3 de SIV ne sont pas neutralisants suggérant ainsi des fonctions différentes dans VIH-1 et SIV. Cependant, cette région reste accessible à ces anticorps après la formation du complexe gp-CD4.

Antigenicity and immunogenicity of the V3 region of SIVmac envelope glycoprotein. Effect of the linear and circular structure on the generation of neutralizing antibodies

GASTON F.*, BABAS T., LAKHDAR-GHAZAL F.*, BAHRAOUI E.*

**Laboratoire d'immuno-virologie, Université Paul Sabatier, UFR/SVT, 31062 Toulouse, France.*

Abstract

The objective of this study was to analyze the immunogenicity and antigenicity of the V3 domain (Cys313-Cys346) of the external envelope glycoprotein gp125 of SIVmac251. The corresponding peptide was synthesized and characterized as linear and cyclic peptides. Our results showed that this region, as for HIV-1, contained an immunodominant epitope. The antigenicity was similar for the linear and cyclic peptides when tested against a panel of 15 sera from SIV infected macaques. Similarly, both peptide structures presented similar immunogenicity as shown by the characterization of the anti-peptide antibodies produced in rabbits against the cyclic and linear forms. But, unexpectedly, the antibodies produced against linear peptide recognized with a relatively higher intensity the native envelope gp140 than those produced against the cyclic structure. Furthermore, we showed that these antibodies recognized better the deglycosylated form of the glycoprotein. But, in contrast to the neutralizing activity obtained with anti-V3 peptides from HIV-1, no antiviral activity was obtained with antibodies generated against linear or cyclic SIVmac V3 peptides

Introduction

Simian immunodeficiency virus (SIV) is a non-human primate lentivirus related to the retroviridae family. It was initially isolated from a captive rhesus monkey [1]. Like human immunodeficiency viruses, HIV-1 and HIV-2, this virus induces an AIDS-like disease only in non-natural monkey hosts, such as Asian monkeys. Although naturally infected, African monkeys develop only an asymptomatic chronic infection [2, 3]. HIV and SIV genomes present similar organization, except for the presence of vpx and Vpu genes in SIV and HIV genomes respectively [4]. SIV also shares several additional properties with HIV including tropism for CD4 positive cells, oligomeric structure of the surface glycoprotein (gpSU) and the transmembrane glycoprotein (gpTM) which are assembled as trimers on the surface of the viral particles. The physiopathology of the infection is also comparable. All these properties make SIV/macaque a valuable model for evaluating candidate vaccines and antiretroviral drugs.

In contrast to HIV-1, the native form of SIV precursor gp140 seems to be essential for the generation of appreciable titers of neutralizing antibodies. Denatured gpSU or synthetic peptides corresponding to that of the HIV-1 principal neutralizing determinant, also named the V3 region, are unable to induce or adsorb measurable amounts of neutralizing antibodies [5]. In line with the latter report, the same group has also shown that SIV-infected monkeys produce neutralizing antibodies that continue to interact with a 45 kDa fragment that includes both V3 and V4 variable loops of SIV gpSU [6]. However, several groups have also described linear neutralizing epitopes in the SIV V2 region between amino acids 170 and 190 [7] and in the V4 loop as shown by the capacity of this peptide to adsorb neutralizing antibodies from the sera of SIV infected macaques [8]. This suggests the presence of a linear epitope of neutralization within this region. In accordance with these results, our group produced and characterized monoclonal antibodies (Mab1B9) which recognized a linear epitope in the V4 region (aa 411-430) of the gpSU and neutralized SIV replication[9].

Several lines of evidence have also shown the crucial role of the conformational structure of gp120 from HIV-1 in the induction of protective immune responses. At least four categories of neutralizing antibodies have been purified from HIV-1 infected human sera, including those directed against the linear epitope within the V3 region, the conformational CD4 binding site, the carbohydrate moieties and the quaternary epitopes present only in the

oligomeric structure of gp120 [10]. In agreement with the production of neutralizing antibodies against the oligomeric form of the viral envelope glycoproteins, it has been shown that the structural antigenicity of the monomeric form of HIV-1 gp120 differs from the oligomeric form [11], and that 70% of HIV-1 sera antibodies bind to epitopes present only in oligomeric envelope proteins [12]. The importance of the quaternary structure of the envelope glycoprotein in the generation of neutralizing antibodies has been confirmed by Lüke et al. [13], who showed that macaques immunized with SIV envelope glycoprotein oligomers were protected against SIVmac32H.

The highly conserved cysteine positions in HIV-1, HIV-2 and SIV SU suggest a considerable structural role for this protein [14]. Moreover, loop regions, which by virtue of their location are prime candidates for the induction of specific antibodies, represent the major targets of the products of the immune responses. As a consequence, the major antigenic sites are located within these variable regions. Immunogenicity and antigenicity of these regions were largely analyzed by using anti-peptide antibodies. The advantage of this approach is that it permits to obtain antibodies that have predetermined specificity, thus allowing some manipulation of the specificity of the immune response. Unfortunately, antibodies produced against synthetic peptides often do not recognize native protein, nor the related whole viral particle, and thus have only a limited application as candidate vaccines when used as linear peptides. Some reasons for this limitation are related to the conformation adopted by the synthetic peptides. In fact, such peptides can exist in two forms, PN and PR. Where PN is the conformation similar to that the peptide would possess in the native protein and PR is the ensemble of unordered or denatured forms of the peptide. It has been estimated that only $1/10^4$ to $1/10^6$ of linear peptides have the correct PN conformation [15-17]. Several methods have been used to enhance the effectiveness of synthetic peptides with varying degrees of success, including circularization of peptides [18-21], multiple repetitions of a protective epitope [22, 23] fusion of T cell and B cell epitopes [24] or engineered peptides in which substitution residues stabilize their secondary structure [19, 25].

In the present study, we evaluated the antigenicity and the capacity of linear and cyclic peptides modeling the V3 region of SIV envelope glycoprotein to induce neutralizing antibodies. To this end, the peptide corresponding to the V3 region (aa 313-346) was chemically synthesized by the solid phase method and purified by chromatography to homogeneity. Cyclic Cys313-Cys346 peptide was obtained after reoxidation and further HPLC purification. Linear and cyclic peptides were used as immunogens to produce specific antibodies in rabbits and as antigens to test a panel of 15 sera obtained from SIV infected

macaques. Our results showed that the V3 peptide of SIV, like its homologue in HIV1, is immunodominant but is unable to induce neutralizing antibodies such as V3 of HIV-1, thus suggesting a different functional role for V3 of SIV.

Material & Methods

Peptide synthesis

The 34 amino acid peptide mimicking the V3 region derived from SIVmac251 envelope glycoprotein was synthesized by the solid phase method using protected Fmoc amino acids [26]. Peptide synthesis was carried out automatically on an Applied Biosystem peptide synthesizer. 0.1 mmole of HMP resin (4-hydroxymethylphenoxymethyl resin) (Novabioche) was used. An additional alanine residue was introduced at the C-terminus of the peptide in order to enhance the efficiency of peptide-resine cleavage. Fmoc-Ala-OH preactivated with TBTU/HOBt/DIEA(1/1/1.5) in DMF was coupled. After 2 hours, the resin was washed with DMF (3x1min) and DCM (3x1min) and the free amino groups were capped with acetic anhydride/DIEA/DMF (3:1:16) (2x30min). The resin was washed with DMF (3x1min) and the Fmoc group was removed with 50% piperidin/DMF (3x5 min). Rink amide linker was coupled after preactivation with TBTU/HOBt/DIEA (1:1:1.5) in DMF. Fmoc/tBu protected amino acids (Iris Biotech GmbH) were incorporated using standard procedures and TBTU/HOBt/DIEA as coupling agents. Fmoc cysteine amino acids were used with unprotected SH. After final deprotection, peptides were acetylated by anhydride acetic treatment (40 eq. of DIEA, 9 eq. of DMF). Concomitant side-chain deprotection and cleavage was performed using 5 ml of a mixture of trifluoroacetic acid (TFA)/H₂O/triisopropylsilane/ethanedithiol (92:4:2:2 v/v/v/v) at 0°C for 30 min and at room temperature for 1.5 hour. TFA was removed by evaporation and the crude peptide was precipitated with tert-butyl methyl ether.

The crude peptide was purified by RP-HPLC on an aquapore RPC30C18 column (22.0x1.0 cm). Peptide was eluted with a 30 min gradient from 30 % to 80 % of buffer B (Buffer A = 0.1%TFA; Buffer B = 60%CH₃CN/40%H₂O/0.1%TFA). The purified peptide was further characterized by aa content determination after hydrolysis (6N HCl, 1 h at 150 °C or 20 h at 110 °C) analytical HPLC, and MALDI-TOF mass spectrometry. The homogeneity of the purified peptide was > 95% as confirmed by the analytical methods.

Reduction and alkylation of V3 peptide

Synthetic peptide was first reduced in 1 ml of buffer containing 0.25 M Tris-base, 6 M guanidine, 14 mM EDTA pH 8.6 with 60 fold excess of DL-dithiothreitol (DTT from Sigma) over sulfhydryl groups. The solution was flushed with nitrogen and maintained at 40°C for 20 h in the dark. Next, a two-fold excess of iodoacetamide over DTT was added for 20 min at room temperature in the dark to prevent secondary reactions. Finally, 5 µl of β-mercaptoethanol was added to stop the reaction. The alkylated peptide was desalted by HPLC, using a C18 column and an H₂O-acetonitrile gradient system containing 0.1% trifluoroacetic acid.

Preparation of cyclic peptide

We first verified the reduction state of the sulfhydryl groups in the peptide by using the Ellman test (Ellman 1959). With this test, we found that about 80% of the peptide presented SH free groups. Total reduction of the peptide was performed by using 1.1 excess of tributylphosphine (Merck) in 2 ml of a mixture of equal volume of 0.1 M Tris –HCl pH 8.0 and n-isopropanol (Merck). Incubation was conducted for 20 h under nitrogen and in darkness. The reduction medium was then diluted in 200 ml of 0.1 M ammonium acetate buffer pH 8.0 and subjected to magnetic stirring for 72 h in contact with air. After lyophilization, the cyclic peptide was purified by HPLC using a C18 column and an H₂O-acetonitrile gradient system containing 0.1% trifluoroacetic acid. The purity of the cyclic peptide was confirmed by mass spectrometry.

Immunization of rabbits

New-Zealand white rabbits were immunized intradermally with 200 µg of linear or cyclic peptide in combination with complete Freund's adjuvant. The rabbits were boosted with three subcutaneous injections with 200 µg of each peptide in combination with incomplete Freund's adjuvant at 4-week intervals. 10 days after each injection, blood samples were taken and analyzed for the presence of anti-peptide antibodies using an ELISA test. Two rabbits were used for immunization with each peptide.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The wells of 96-well microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with either linear or cyclic peptide (500 ng in 50 μ l of PBS, pH7.4) and left overnight at 4°C. After saturation with 200 μ l of PBS supplemented with 5% of non-fat milk for 1 h at 37°C and washing with 0.2% Tween-20 in PBS, 50 μ l of different serum dilutions were added and incubated for 2 h at 37°C. After rinsing, 50 μ l of 1/1000 of horseradish peroxidase labelled anti-rabbit (Dako, Glostrup, Denmark) was added for 1 h at 37°C. After further rinsing, 100 μ l of orthophenylenediamine were added and the samples incubated for 30 min in the dark at room temperature. The reaction was stopped by adding 25 μ l of 4 N sulfuric acid and the 490/600 nm absorbance ratio was determined. Serum titer was defined as the highest dilution which gave a positive signal.

Recombinant soluble gp140

Recombinant soluble gp140 of SIVmac251 [27] was obtained from Pasteur Mérieux Serum et Vaccin (Val de Reuil, France). Briefly, the env-coding sequence of gp140 was derived from SIVmac251 envelope precursor protein by deletion of the potential transmembrane segment (Ile693-Leu716). The potential cleavage site was also mutated to prevent processing of the SU and TM proteins. Recombinant vaccinia-virus-infected BHK cells produced gp140, which was then purified from the supernatant by lectin affinity chromatography and gel filtration.

Radio-immunoassay (RIA)

SIVmac251 gp140 was iodinated as described previously [28]. RIA was performed as follows: 50 μ l of 125 I-gp140 (10^5 cpm) was incubated with various serum dilutions for 2 h at 37°C. The complexes formed between 125 Igp140 and anti-peptide antibodies were immunoprecipitated during 1 h at room temperature with 100 μ l of Protein A-Sepharose (1.5 g/50 ml) in PBS, pH 7.4 containing 0.5% BSA and 0.05% NaN₃. After washing twice with the same buffer containing 0.05% Tween-20, bound radioactivity was counted in a gamma counter.

Deglycosylation of ^{125}I -gp140

^{125}I gp140 (10^7 cpm) in PBS buffer pH 7.4 was incubated at 37°C with endoglycosidase F/N-glycosidase F (400 mU) (Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Germany). The glycosidase enzyme was added in three aliquots at 6 h intervals. The reaction of deglycosylation was controlled by SDS-PAGE and autoradiography.

Cells and virus

CEMx174 cells, H9 cells chronically infected with SIVmac251, uninfected C8166 cells and human peripheral blood cells (PBL) were cultured in RPMI-1640 medium (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with 10% of foetal calf serum (ATGC, Orleans, France), 2 mM glutamine, and antibiotics (100 IU penicillin and 100 mg/ streptomycin) (Eurobio, Les Ulis, France) in a 5% CO₂ humidified atmosphere. PBL from healthy human donors were separated by Ficoll-Hypaque, stimulated with phytohemagglutinin P (PHA-P from Difco laboratories, Detroit, Michigan, USA) diluted at 10 µg/ml for 72 h at 37°C, infected with SIVmac251 and maintained in a culture medium containing 20 U/ml of IL-2.

SIVmac 251 was kindly provided by Dr. L.Montagnier, Institut Pasteur, Paris, France.

Inhibition of syncytium formation and virus neutralization assays:

Briefly, 10^4 H9 or PBL chronically infected cells were incubated with various dilutions (1/10-1/1000) of anti-peptide sera previously inactivated by heating for 20 mn at 56°C. After 1 h at 37°C, 4×10^4 uninfected C8166 cells were added and cocultured for 18 h at 37°C. The number of syncytia was then scored under a microscope. In each experiment, the effect of 2.5 µg/ml of anti-Leu3a (Becton Dickenson, San Diego, USA) was used in parallel as a positive control for total inhibition of cell fusion.

Neutralizing activities of linear and cyclic anti-peptide antibodies were tested on human PBL and CEMx174 as targets for SIVmac251. The neutralization assay (titer reduction assay) was performed as described in [29].

Labelling by anti-peptide antibodies of SIV envelope bound to CEM cells CD4

Soluble SIV envelope glycoprotein gp140 was incubated for 1 h at 37°C with various dilutions of anti-V3 peptide. The preformed complex gp140-antipeptide was incubated with 10⁶ CEM cells for 30 min at 37°C in 20 µl of PBS buffer pH 7.4 supplemented with 0.5% BSA and 0.05% NaN₃. After two washes, cells were incubated again for 30 mn at 4°C with 1/25 swine anti-rabbit Ig complexed with biotin (Amersham). Cells were then washed and resuspended in 25 µl of 1/25 streptavidin-phycoerythrin (Becton-Dickinson) in the cold. After two more washes, cells were resuspended in 500 µl of PBS buffer with 1% paraformaldehyde. Membrane fluorescence intensity was measured with a FACS analyser (Becton-Dickinson).

Results

The objective of our study was to compare the antigenicity and immunogenicity of the V3 region of the envelope glycoprotein of SIV. To this end, linear and cyclic peptides mimicking this region were produced and characterized for their homogeneity. These peptides were tested (a) for their activity to interact with anti-envelope glycoprotein antibodies present in the sera of SIV infected macaques and (b) for their capacities to generate specific antibodies able to recognize and neutralize SIV infection.

Characterization of linear and cyclic peptides

Peptide mimicking the V3 region of the external envelope glycoprotein of SIVmac251 (figure 1) was synthesized using a solid phase method with Fmoc amino acids strategy. The assembled peptide, containing unprotected SH of cysteines, was purified to homogeneity by HPLC (figure 2a). After SH quantification by the Ellman test, more than 80% of the peptide was shown to be present in reduced form. The small peak (figure 2b) corresponds to the cyclic peptide. The homogeneity of the peptide was further confirmed by amino acid composition and molecular weight determination by MALDI-TOF. Purified peptide was subjected to an additional reduction followed by SH alkylation (figure 2b). Despite this modification, the alkylated peptide was eluted at a similar retention time as its reduced form (figure 2a, 2b). However, the aim of this step was to prevent the formation of cyclic or oligomeric peptides

during the use of this peptide and, thus, to be sure that all the biological conclusions obtained with this structure of the peptide were really related to the linear form.

To obtain the cyclic form, previously reduced peptide with a slight excess of tributylphosphine was diluted in 0.1 ammonium acetate buffer pH 8.0, and air oxidation was conducted in a large volume for 48 h. The kinetics of oxidation was monitored by HPLC (figure 3). Before oxidation, the chromatogram exhibit one peak (figure 3a). After 12h, three peaks corresponding to two forms of cyclic and linear peptides can be identified (figure 3b). The peak eluted with an intermediate retention time corresponds to the linear form (figure 3b). After 48h of oxidation, this peak completely disappeared, suggesting total oxidation (figure 3c). The position of the peak corresponding to the linear peptide was further confirmed by adding an exogenous aliquot of this peptide to the purified product obtained after 48 h of oxidation (figure 4). The corresponding contents of each peak were further analyzed by MALDI-TOF. This characterization showed that the determined MW of the second peak (MW=3919.6 Da) was in agreement with the expected MW of the correct cyclic peptide, while that of the first one (MW= 3935.6 Da) seemed to correspond to V3 peptide with an oxidized methionine as suggested by its upper MW of 16 Da.

Antigenicity of linear and cyclic V3 peptide

Linear and cyclic peptides were used as antigens and tested by ELISA, in the same conditions, against a panel of 15 sera obtained from macaques infected with SIVmac251 (clone BK28). Preimmune sera, obtained from the same macaques, were used as controls. The results obtained showed that: i) a significant reactivity against both linear and cyclic peptides was observed with all the sera tested. This reactivity seems to be specific as shown by the absence of positive signals with preimmune sera (figure 5). This result clearly demonstrated the presence of an immunodominant antigenic determinant in the V3 region of the SU of SIV. ii) among the 15 sera tested, 10 seemed to recognize the cyclic form of the V3 peptide better than the linear form, while sera from macaques C305 and C298 recognized the linear peptide better (figure 5). But, overall, the antigenicity between linear and cyclic peptides remained comparable as shown in figure 5. It is interesting to note that these results are comparable to those previously reported for the V3 region of HIV-1 [30]. However, in contrast to HIV-1, the sequence of the V3 region in SIV seems to be less variable, as reported by Burns and Desrosiers [31].

Immunogenicity and antigenicity of linear and cyclic V3 peptide

Sera produced against linear and cyclic V3 peptides were obtained with high titers (10^7) when tested by ELISA against adsorbed peptides. Interestingly, the anti-peptide antibodies produced against the linear V3 peptide recognized the linear structure with the same intensity as the cyclic one. Antibodies produced against the V3 loop exhibited a similar spectrum of reactivity against both structures of V3 peptides (figure 6). This result suggests that cyclization did not introduce sufficient structural constraints to generate antibodies able to differentiate between the two forms (linear and cyclic), at least when the antigenicity was tested against peptides in ELISA.

Reactivity of anti-peptide antibodies against native envelope glycoprotein

In order to evaluate the binding activity of anti-peptide antibodies against native gp140 of SIV, anti-peptide antibodies were tested in a liquid phase RIA, which enabled antigen-antibody interactions to be measured in non-denaturing conditions. The results obtained showed that both linear and cyclic peptides were able to generate antibodies that recognized native envelope glycoprotein (figure 7). Antibodies produced against linear peptide were produced with a titer 10 times higher than those obtained against cyclic peptide. This result showed that, in contrast to the results obtained in the antigenicity tests and contrary to the hypothesis advanced, cyclization of the peptide contributed negatively to the generation of antibodies that recognize native envelope glycoproteine. The better reactivity observed with anti-linear peptide may be also explained by its better flexibility, which may better mimic native immunogenic determinants than the more rigid cyclic structure.

Because V3 contains a conserved N-linked glycosylation site, we tested the effect of carbohydrate moieties on antigen-antibody interactions. To this end, deglycosylated ^{125}I gp140 was tested in RIA against antibodies produced against cyclic and linear peptides. The results, depicted in figure 8, showed an enhancement in the reactivity of anti-peptide against the deglycosylated envelope glycoprotein form. These results clearly demonstrated the role of glycan moieties to interfere negatively with the binding of antibodies to their corresponding antigenic sites. This is one mechanism by which infectious agents, including viruses, can escape immune system defences.

Neutralization activity of anti-peptide antibodies

The neutralization capacity of anti-peptide antibodies produced against linear and cyclic peptides was tested in two assays. The first was syncytium inhibition activity in vitro. Chronically infected H9 or human peripheral blood lymphocyte cells were cocultured with uninfected C8166 cells in the presence of various dilutions of anti-peptide sera, or with anti-CD4 Leu3a as positive control. As expected, anti-CD4 Leu3a completely inhibited cell fusion, while none of the anti-peptide antibodies inhibited syncytia formation.

We also carried out a cell-free virus neutralization assay against SIVmac251. The assay was based on the capacity of anti-peptide antibodies to inhibit virus infection of CEMx174 and PBL cells. None of the antibodies produced against linear or cyclic peptides displayed significant neutralizing activity against SIVmac251. These results showed that anti-V3 antibodies were unable to prevent binding of soluble recombinant gp140 to CD4 receptor on the CEM cells. This indicates that the V3 region remained accessible to antibody binding after gp-CD4 complex formation and also suggests that, at biological level, this region does not interfere physically with CD4 binding sites.

Discussion

SIV shares several common properties with HIV-1 including tropism for receptors CD4 and CCR5/CXCR4, and the establishment of an AIDS-like disease [32, 33]. Thus, the SIV/maaque model is valuable for pathogenesis studies and vaccine development. As for HIV-1, the envelope glycoprotein of SIV has four variable loops formed by highly conserved cysteines. This common conserved secondary structure of the gpSU seems to play a crucial role in the conservation of the bioactive conformation of this protein. Reduction of preformed S-S bridges totally abolishes the capacity of SIV and HIV envelope glycoproteins to interact with CD4 receptors [34] and with some neutralizing antibodies that recognize conformational epitopes [35, 36].

Like the conserved regions, variable regions also play an essential role in the first steps of a viral cycle. For example, following gp-CD4 interaction, V1 and V2 domains are rearranged in order to make a coreceptor binding site accessible [37-39]. Similarly, some

conserved residues located at the tip and the stem of the V3 loop of HIV-1 have been reported to be important for gp-coreceptor interactions and virus entry [40-42]. Many studies have also suggested that glycosylation in VI, V2 and V3 regions seems to be essential in the tropism of the viruses [43, 44] and in the accessibility of neutralizing antibodies to the receptor binding domains [45]. However, studies reported by our group have demonstrated that glycan moieties of HIV-1, HIV-2 and SIV envelope glycoproteins play only a limited role as shown by the capacity of totally deglycosylated gp SU of these viruses to continue to interact with CD4 [28, 46, 47]. Furthermore, we have shown that deglycosylated HIV-1 viral particles conserve some of their infectious power [46]. This apparent discrepancy between our studies and others [48-50] may be explained by the fact that carbohydrate moieties may be essential for the acquisition of the native conformation of the envelope glycoproteins.

In addition, these variable regions, which are more accessible at the surface of the proteins are more immunogenic than the less accessible conserved domains (C1-C5). In consequence: i) variable regions are further targeted by non-efficient neutralizing antibodies, also defined as inhibitors of neutralizing antibodies. In fact, such antibodies continue to coexist in the sera of HIV infected patients, in the presence of the infectious viruses, ii) also, these variable regions may act by occluding the accessibility of conserved regions and thus reducing their immunogenicity and may prevent the binding of neutralizing antibodies, even if they are present, to these regions. The potential of the generation of such neutralizing antibodies is consistent with the reported neutralizing monoclonal antibodies directed against conserved peptidic regions such as b12 and 2F5 or against conserved glycanic domains such as human monoclonal antibodies 2G12 [51-53].

Several reports emphasize the importance of glycosylation at the level of variable regions on the generation of neutralizing antibodies. For example, Reitter et al [54] showed that some mutations at the potential glycosylation sites within V1 and V2 regions may generate infectious viruses able to generate a greater amount of neutralizing antibodies, also able to neutralize the wild type virus. Inversely, it has been reported that some mutations, consisting of a deletion of 100 amino acids, which abolish glycosylation sites in the transmembrane glycoprotein ectodomain of SIVmac239 lead to the obtention of replicative viruses which become sensitive to neutralization by sera produced against wild type virus [55]. More recently, it has been reported that deletion of an N-glycosylation site in the V1 region may influence the specificity of the produced anti-V3 antibodies [56]. Taken together, these results underline the importance of the three-dimensional structure of the V3 loop beyond its secondary structure, and the structure of carbohydrate chains located in V1, V2 and

V3 loops. In a previous work, we showed that desialylated gp160 of HIV-1, obtained after neuraminidase treatment, generated antibodies with a broad spectrum of reactivity, as shown by their capacity to cross react with HIV-2 glycoproteins[57].

Synthetic peptides mimicking the V3 loop of the envelope from SIVmac251 and HIV-2 Rod contained 36 and 34 amino acid residues respectively. In addition to the two cysteine residues, the N glycosylation site as the sequence at the tip of the loop is conserved. In the present study, synthetic V3 peptide was assembled by the solid phase method using protected Fmoc amino acids. To obtain cyclized peptide, Cys-Cys disulfide bridges were made after reduction of the sulfhydryl groups and air reoxidation.. The kinetics of oxidation was followed by HPLC and showed a total reoxidation after 48 h, with the apparition of two distinguishable peaks, both corresponding to cyclic peptides. Mass spectrometry analysis showed that the first peak, with the early retention time, corresponded to a side product due to the oxidation of the methionine 327 while the correct cyclic peptide was eluted in the second peak. Two additional interesting remarks can be made on the kinetics of reoxidation of V3 peptide: i) after 48 h of reoxidation, the totality of the peptide was cyclized as demonstrated by the absence of the peak corresponding to the linear form, ii) no formation of oligomeric peptides was detected, as judged by the absence of additional peaks in the HPLC profile. This situation may be explained by the fact that reoxidation was performed in a large volume, not favourable for intermolecular interactions, or by structural parameters intrinsic to the V3 peptide, which favours intramolecular oxidation.

In the present study, only the correct cyclized V3 peptide was used. Concerning the experiments performed with the linear form of the V3 peptide, free sulfhydryl groups were alkylated in order to prevent formation of cyclic peptides during peptide utilisation.

To evaluate the effect of the secondary structure and that of N-linked carbohydrate moieties of the SIV envelope glycoprotein, antibodies produced against linear and cyclic synthetic V3 peptide (Cys313-Cys346) were tested for their reactivities against native and totally deglycosylated envelope protein. The results obtained showed that anti-linear and anti-cyclic anti-peptide antibodies recognized linear and cyclic peptides similarly when tested by ELISA. These results suggest two interpretations: i) cyclization of the peptide has no effect on its immunogenicity, or ii) various sub-populations of antibodies, with different specificities, are present in the polyclonal antipeptide sera prepared against each peptide structure. This hypothesis is in line with the report showing the presence of an additional conserved neutralizing epitope around the GPGR sequence located at the tip of the V3 of HIV-1 [58].

Both anti-peptide antibodies, produced against linear or cyclic peptides, recognized the native envelope glycoprotein when tested in a liquid radio-immunoassay. However, contrary to the hypothesis advanced, our data showed that anti-linear peptide antibodies recognized native envelope glycoprotein with a relatively better titer, about 10 times higher, than those produced against cyclic peptide. These results suggest that the cyclization of the peptide is not sufficient to induce a more native-like structure or that linear peptide mimicks this native-like domain better. However, in this work, we showed that cyclic and linear peptides were recognized by all the sera (15/15) with a comparable antigenicity, confirming the presence of an immunodominant antigenic site in this region as also described for HIV-1 and HIV-2 [59, 60]. Despite the presence of anti-peptide antibodies able to recognize native envelope glycoprotein, these antibodies were unable to inhibit syncytium formation in coculture of infected and non-infected cells. In accordance with the latter result, these anti-peptide antibodies also failed to inhibit SIVmac251 replication in primary blood lymphocytes. These results agree with those reported for V3 of HIV-2 by various groups [61, 62] including ours [63]. However, using monoclonal or anti-peptide antibody approaches, several neutralizing antibodies have been described and the recognized epitopes of some of them identified in the envelope glycoprotein sequence. Accordingly, linear neutralizing antigenic sites including epitopes in V1 [7, 63-65], V4 [6, 9] and the ectodomain of gp41 [6, 9, 65, 66] have been described. But many conflicting results have been reported for the capacity of the V3 region to generate neutralizing antibodies [5, 29, 67].

In our study, we showed that both linear and cyclic V3 peptides exhibited a similar antigenicity, suggesting the presence of an immunodominant linear antigenic site in this region. However, in contrast to V3 of HIV-1, antibodies produced against linear or cyclic peptide were unable to neutralize SIV infection. This result suggests a different functional role for the V3 region in the SIV replication cycle.

References

- 1 Daniel, M. D., Letvin, N. L., King, N. W., Kannagi, M., Sehgal, P. K., Hunt, R. D., Kanki, P. J., Essex, M. and Desrosiers, R. C. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques *Science* 1985; 228: 1201
- 2 Fukasawa, M., Miura, T., Hasegawa, A., Morikawa, S., Tsujimoto, H., Miki, K., Kitamura, T. and Hayami, M. Sequence of simian immunodeficiency virus from African green monkey, a new member of the HIV/SIV group *Nature* 1988; 333: 457
- 3 Kraus, G., Werner, A., Baier, M., Binniger, D., Ferdinand, F. J., Norley, S. and Kurth, R. Isolation of human immunodeficiency virus-related simian immunodeficiency viruses from African green monkeys *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2892
- 4 Yu, X. F., Yu, Q. C., Essex, M. and Lee, T. H. The vpx gene of simian immunodeficiency virus facilitates efficient viral replication in fresh lymphocytes and macrophage *J Virol* 1991; 65: 5088
- 5 Javaherian, K., Langlois, A. J., Schmidt, S., Kaufmann, M., Cates, N., Langedijk, J. P., Meloen, R. H., Desrosiers, R. C., Burns, D. P., Bolognesi, D. P. and et al. The principal neutralization determinant of simian immunodeficiency virus differs from that of human immunodeficiency virus type 1 *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 1418
- 6 Javaherian, K., Langlois, A. J., Montefiori, D. C., Kent, K. A., Ryan, K. A., Wyman, P. D., Stott, J., Bolognesi, D. P., Murphey-Corb, M. and Larosa, G. J. Studies of the conformation-dependent neutralizing epitopes of simian immunodeficiency virus envelope protein *J Virol* 1994; 68: 2624
- 7 Benichou, S., Legrand, R., Nakagawa, N., Faure, T., Traincard, F., Vogt, G., Dormont, D., Tiollais, P., Kieny, M. P. and Madaule, P. Identification of a neutralizing domain in the external envelope glycoprotein of simian immunodeficiency virus *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8: 1165
- 8 Torres, J. V., Malley, A., Banapour, B., Anderson, D. E., Axthelm, M. K., Gardner, M. B. and Benjamini, E. An epitope on the surface envelope glycoprotein (gp130) of simian immunodeficiency virus (SIVmac) involved in viral neutralization and T cell activation *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9: 423
- 9 Babas, T., Belhadj-Jrad, B., Le Grand, R., Dormont, D., Montagnier, L. and Bahraoui, E. Specificity and neutralizing capacity of three monoclonal antibodies produced against the envelope glycoprotein of simian immunodeficiency virus isolate 251 *Virology* 1995; 211: 339
- 10 Steimer, K. S., Scandella, C. J., Skiles, P. V. and Haigwood, N. L. Neutralization of divergent HIV-1 isolates by conformation-dependent human antibodies to Gp120 *Science* 1991; 254: 105
- 11 Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Wyatt, R. and Sodroski, J. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies *J Virol* 1994; 68: 469
- 12 Richardson, T. M., Jr., Stryjewski, B. L., Broder, C. C., Hoxie, J. A., Mascola, J. R., Earl, P. L. and Doms, R. W. Humoral response to oligomeric human immunodeficiency virus type 1 envelope protein *J Virol* 1996; 70: 753
- 13 Luke, W., Coulibaly, C., Dittmer, U., Voss, G., Oesterle, R., Makoschey, B., Sauermann, U., Jurkiewicz, E., Stahl-Henning, C., Petry, H. and Hunsmann, G. Simian immunodeficiency virus (SIV) gp130 oligomers protect rhesus macaques

- (*Macaca mulatta*) against the infection with SIVmac32H grown on T-cells or derived ex vivo *Virology* 1996; 216: 444
- 14 Hoxie, J. A. Hypothetical assignment of intrachain disulfide bonds for HIV-2 and SIV envelope glycoproteins *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7: 495
 - 15 Chavez, L. G., Jr. and Scheraga, H. A. Intrinsic stabilities of portions of the ribonuclease molecule *Biochemistry* 1980; 19: 1005
 - 16 Furie, B., Schechter, A. N., Sachs, D. H. and Anfinsen, C. B. An immunological approach to the conformational equilibrium of staphylococcal nuclease *J Mol Biol* 1975; 92: 497
 - 17 Sachs, D. H., Schechter, A. N., Eastlake, A. and Anfinsen, C. B. An immunologic approach to the conformational equilibria of polypeptides *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69: 3790
 - 18 Neurath, A. R., Strick, N., Fields, R. and Jiang, S. Peptides mimicking selected disulfide loops in HIV-1 gp120, other than V3, do not elicit virus-neutralizing antibodies *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7: 657
 - 19 Schulze-Gahmen, U., Klenk, H. D. and Beyreuther, K. Immunogenicity of loop-structured short synthetic peptides mimicking the antigenic site A of influenza virus hemagglutinin *Eur J Biochem* 1986; 159: 283
 - 20 Satterthwait, A. C., Arrhenius, T., Hagopian, R. A., Zavala, F., Nussenzweig, V. and Lerner, R. A. Conformational restriction of peptidyl immunogens with covalent replacements for the hydrogen bond *Vaccine* 1988; 6: 99
 - 21 Christodoulides, M., McGuinness, B. T. and Heckels, J. E. Immunization with synthetic peptides containing epitopes of the class 1 outer-membrane protein of *Neisseria meningitidis*: production of bactericidal antibodies on immunization with a cyclic peptide *J Gen Microbiol* 1993; 139: 1729
 - 22 Palker, T. J., Matthews, T. J., Langlois, A., Tanner, M. E., Martin, M. E., Scarce, R. M., Kim, J. E., Berzofsky, J. A., Bolognesi, D. P. and Haynes, B. F. Polyvalent human immunodeficiency virus synthetic immunogen comprised of envelope gp120 T helper cell sites and B cell neutralization epitopes *J Immunol* 1989; 142: 3612
 - 23 Wang, C. Y., Looney, D. J., Li, M. L., Walfield, A. M., Ye, J., Hosein, B., Tam, J. P. and Wong-Staal, F. Long-term high-titer neutralizing activity induced by octameric synthetic HIV-1 antigen *Science* 1991; 254: 285
 - 24 Ahlers, J. D., Dunlop, N., Pendleton, C. D., Newman, M., Nara, P. L. and Berzofsky, J. A. Candidate HIV type 1 multideterminant cluster peptide-P18MN vaccine constructs elicit type 1 helper T cells, cytotoxic T cells, and neutralizing antibody, all using the same adjuvant immunization *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 259
 - 25 Kobs-Conrad, S., Lee, H., DiGeorge, A. M. and Kaumaya, P. T. Engineered topographic determinants with alpha beta, beta alpha beta, and beta alpha beta alpha topologies show high affinity binding to native protein antigen (lactate dehydrogenase-C4) *J Biol Chem* 1993; 268: 25285
 - 26 Merrifield, B. Solid phase synthesis *Science* 1986; 232: 341
 - 27 Chakrabarti, L., Guyader, M., Alizon, M., Daniel, M. D., Desrosiers, R. C., Tiollais, P. and Sonigo, P. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses *Nature* 1987; 328: 543
 - 28 Benjouad, A., Babas, T., Montagnier, L. and Bahraoui, E. N-linked oligosaccharides of simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins are dispensable for the interaction with the CD4 receptor *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 190: 311
 - 29 Le Grand, R., Vogt, G., Vaslin, B., Roques, P., Theodoro, F., Aubertin, A. M. and Dormont, D. Specific and non-specific immunity and protection of macaques against SIV infection *Vaccine* 1992; 10: 873

- 30 Javaherian, K., Langlois, A. J., LaRosa, G. J., Profy, A. T., Bolognesi, D. P., Herlihy, W. C., Putney, S. D. and Matthews, T. J. Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1 *Science* 1990; 250: 1590
- 31 Burns, D. P. and Desrosiers, R. C. Selection of genetic variants of simian immunodeficiency virus in persistently infected rhesus monkeys *J Virol* 1991; 65: 1843
- 32 Kanki, P. J., McLane, M. F., King, N. W., Jr., Letvin, N. L., Hunt, R. D., Sehgal, P., Daniel, M. D., Desrosiers, R. C. and Essex, M. Serologic identification and characterization of a macaque T-lymphotropic retrovirus closely related to HTLV-III *Science* 1985; 228: 1199
- 33 Letvin, N. L., Daniel, M. D., Sehgal, P. K., Desrosiers, R. C., Hunt, R. D., Waldron, L. M., MacKey, J. J., Schmidt, D. K., Chalifoux, L. V. and King, N. W. Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III *Science* 1985; 230: 71
- 34 Belhadj Jrad, B. and Bahraoui, E. Antigenicity of linear and cyclic peptides mimicking the disulfide loops in HIV-2 envelope glycoprotein: synthesis, reoxidation and purification *J Pept Res* 1998; 51: 370
- 35 Finnegan, C. M., Berg, W., Lewis, G. K. and DeVico, A. L. Antigenic properties of the human immunodeficiency virus envelope during cell-cell fusion *J Virol* 2001; 75: 11096
- 36 Kropelin, M., Susal, C., Daniel, V. and Opelz, G. Inhibition of HIV-1 gp120 binding to CD4+ T cells by monoclonal antibodies directed against the gp120 C1 or C4 region *Immunol Lett* 1998; 63: 19
- 37 Moore, J. P. and Binley, J. HIV. Envelope's letters boxed into shape *Nature* 1998; 393: 630
- 38 Moore, J. P. and Nara, P. L. The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection *Aids* 1991; 5 Suppl 2: S21
- 39 Moore, J. P., Trkola, A. and Dragic, T. Co-receptors for HIV-1 entry *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 551
- 40 Cormier, E. G. and Dragic, T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor *J Virol* 2002; 76: 8953
- 41 Resch, W., Hoffman, N. and Swanstrom, R. Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks *Virology* 2001; 288: 51
- 42 Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A. and Sodroski, J. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding *Science* 1998; 280: 1949
- 43 Kolchinsky, P., Kiprilov, E., Bartley, P., Rubinstein, R. and Sodroski, J. Loss of a single N-linked glycan allows CD4-independent human immunodeficiency virus type 1 infection by altering the position of the gp120 V1/V2 variable loops *J Virol* 2001; 75: 3435
- 44 Ogert, R. A., Lee, M. K., Ross, W., Buckler-White, A., Martin, M. A. and Cho, M. W. N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism *J Virol* 2001; 75: 5998
- 45 Losman, B., Bolmstedt, A., Schonning, K., Bjorndal, A., Westin, C., Fenyo, E. M. and Olofsson, S. Protection of neutralization epitopes in the V3 loop of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 by N-linked oligosaccharides in the V1 region *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 1067

- 46 Fenouillet, E., Clerget-Raslain, B., Gluckman, J. C., Guetard, D., Montagnier, L. and Bahraoui, E. Role of N-linked glycans in the interaction between the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus and its CD4 cellular receptor. Structural enzymatic analysis *J Exp Med* 1989; 169: 807
- 47 Bahraoui, E., Benjouad, A., Guetard, D., Kolbe, H., Gluckman, J. C. and Montagnier, L. Study of the interaction of HIV-1 and HIV-2 envelope glycoproteins with the CD4 receptor and role of N-glycans *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8: 565
- 48 Gruters, R. A., Neefjes, J. J., Tersmette, M., de Goede, R. E., Tulp, A., Huisman, H. G., Miedema, F. and Ploegh, H. L. Interference with HIV-induced syncytium formation and viral infectivity by inhibitors of trimming glucosidase *Nature* 1987; 330: 74
- 49 Matthews, T. J., Weinhold, K. J., Lyster, H. K., Langlois, A. J., Wigzell, H. and Bolognesi, D. P. Interaction between the human T-cell lymphotropic virus type IIIB envelope glycoprotein gp120 and the surface antigen CD4: role of carbohydrate in binding and cell fusion *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 5424
- 50 Robinson, W. E., Jr., Montefiori, D. C. and Mitchell, W. M. Evidence that mannosyl residues are involved in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) pathogenesis *AIDS Res Hum Retroviruses* 1987; 3: 265
- 51 Mascola, J. R., Stiegler, G., VanCott, T. C., Katinger, H., Carpenter, C. B., Hanson, C. E., Beary, H., Hayes, D., Frankel, S. S., Birx, D. L. and Lewis, M. G. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies *Nat Med* 2000; 6: 207
- 52 Roben, P., Moore, J. P., Thali, M., Sodroski, J., Barbas, C. F., 3rd and Burton, D. R. Recognition properties of a panel of human recombinant Fab fragments to the CD4 binding site of gp120 that show differing abilities to neutralize human immunodeficiency virus type 1 *J Virol* 1994; 68: 4821
- 53 Sanders, R. W., Venturi, M., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Katinger, H., Lloyd, K. O., Kwong, P. D. and Moore, J. P. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120 *J Virol* 2002; 76: 7293
- 54 Reitter, J. N., Means, R. E. and Desrosiers, R. C. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS *Nat Med* 1998; 4: 679
- 55 Johnson, W. E., Morgan, J., Reitter, J., Puffer, B. A., Czajak, S., Doms, R. W. and Desrosiers, R. C. A replication-competent, neutralization-sensitive variant of simian immunodeficiency virus lacking 100 amino acids of envelope *J Virol* 2002; 76: 2075
- 56 Cole, K. S., Steckbeck, J. D., Rowles, J. L., Desrosiers, R. C. and Montelaro, R. C. Removal of N-linked glycosylation sites in the V1 region of simian immunodeficiency virus gp120 results in redirection of B-cell responses to V3 *J Virol* 2004; 78: 1525
- 57 Benjouad, A., Gluckman, J. C., Montagnier, L. and Bahraoui, E. Specificity of antibodies produced against native or desialylated human immunodeficiency virus type 1 recombinant gp160 *J Virol* 1993; 67: 1693
- 58 Zolla-Pazner, S., Cohen, S. S., Krachmarov, C., Wang, S., Pinter, A. and Lu, S. Focusing the immune response on the V3 loop, a neutralizing epitope of the HIV-1 gp120 envelope *Virology* 2007:
- 59 Vogel, T., Kurth, R. and Norley, S. The majority of neutralizing Abs in HIV-1-infected patients recognize linear V3 loop sequences. Studies using HIV-1MN multiple antigenic peptides *J Immunol* 1994; 153: 1895
- 60 Bjorling, E., Chiodi, F., Utter, G. and Norrby, E. Two neutralizing domains in the V3 region in the envelope glycoprotein gp125 of HIV type 2 *J Immunol* 1994; 152: 1952

- 61 Robert-Guroff, M., Aldrich, K., Muldoon, R., Stern, T. L., Bansal, G. P., Matthews, T. J., Markham, P. D., Gallo, R. C. and Franchini, G. Cross-neutralization of human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus isolates *J Virol* 1992; 66: 3602
- 62 Traincard, F., Rey-Cuille, M. A., Huon, I., Darteville, S., Mazie, J. C. and Benichou, S. Characterization of monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoproteins *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 1659
- 63 Babas, T., Benichou, S., Guetard, D., Montagnier, L. and Bahraoui, E. Specificity of antipeptide antibodies produced against V2 and V3 regions of the external envelope of human immunodeficiency virus type 2 *Mol Immunol* 1994; 31: 361
- 64 Jurkiewicz, E., Hunsmann, G., Schaffner, J., Nisslein, T., Luke, W. and Petry, H. Identification of the V1 region as a linear neutralizing epitope of the simian immunodeficiency virus SIVmac envelope glycoprotein *J Virol* 1997; 71: 9475
- 65 Kent, K. A., Rud, E., Corcoran, T., Powell, C., Thiriart, C., Collignon, C. and Stott, E. J. Identification of two neutralizing and 8 non-neutralizing epitopes on simian immunodeficiency virus envelope using monoclonal antibodies *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8: 1147
- 66 Kodama, T., Burns, D. P., Silva, D. P., Veronese, F. D. and Desrosiers, R. C. Strain-specific neutralizing determinant in the transmembrane protein of simian immunodeficiency virus *J Virol* 1991; 65: 2010
- 67 Palker, T. J., Muir, A. J., Spragion, D. E., Staats, H. F., Langlois, A. and Montefiori, D. C. The V3 domain of SIVmac251 gp120 contains a linear neutralizing epitope *Virology* 1996; 224: 415

Figure legends

Figure 1: **a.** Hypothetical assignment of disulfide bonds for SIVmac251 external envelope glycoprotein as suggested by Hoxie et al 1991. The disulfide bonds are numbered from 1 to 11. Glycosylation sites are shown ●. The conserved (C1-C5) and variable (V1-V5) regions are indicated. **b.** Presentation of the secondary structure of the V3 region of SIVmac251 (BK28 clone)

Figure 2: Analytical high performance liquid chromatography of linear V3 as obtained after its purification on a C18 column. **a.** V3 peptide before alkylation of free SH groups. **b.** V3 peptide after alkylation of free SH groups. An aquapore C18 RP300 column (24x4.6mm) was used. Elution was performed with 0.1% TFA system buffer with a 25 min linear gradient from 10 to 100% of buffer A. Buffer A= 0.1% TFA, buffer B= 60% CH₃CN/ 40% H₂O/ 0.1% TFA.

Figure 3: Kinetics of V3 peptide oxidation followed by HPLC analysis. Conditions of elution are the same as in figure 2. The content of each peak was collected and analyzed by MALDI-TOF. a: time= 0 min, b: time= 12 h of oxidation, c: time= 48 h of oxidation.

Figure 4: V3 peptide obtained after 48h of oxidation was collected and added to an aliquot of totally linear peptide and this mixture was analyzed in the same conditions by HPLC. The analysis showed three separate structures. As expected, the linear peptide was eluted with the intermediate retention time. Conditions of elution were the same as for figures 2 and 3 except that peptides were eluted with a 30 min gradient from 30 to 80% of buffer B on a RPC30 C18 column (22.0x1cm).

Figure 5: Comparative analysis by ELISA of the antigenicity of linear and cyclic V3 peptides. Immune and pre-immune sera of 15 SIV infected macaques were tested at 1/500 dilution.

Figure 6: Titration by ELISA of anti-peptide sera tested at various dilutions (1/10 to 1/10⁸) against various coated linear or cyclic peptides. Rabbit pre-immune serum was used as control.

Figure 7: Analysis by radioimmunoassay of the reactivity of anti-linear and anti-cyclic anti-peptide antibodies. Native (N) or deglycosylated (D) ^{125}I gp140 from SIVmac251 was tested against various dilution of immune sera (I) (1/10 to 1/10⁶). Antigen-antibody complexes were immunoprecipitated by Protein A-sepharose. Pre-immune sera (PI) were used as controls.

Figure 8: Labelling of soluble recombinant SIV gp140 binding to CD4⁺ CEM cells with anti-V3 antibodies. For specific binding, immune serum (I) was used at 1/100 (b) and 1/1000 (c). Non-specific binding was analyzed with preimmune serum at 1/100 (a).

Figure 1

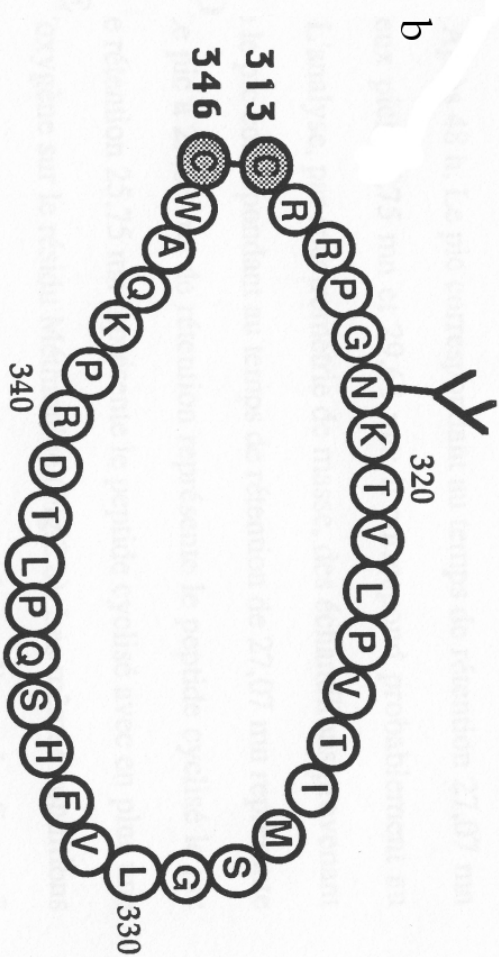
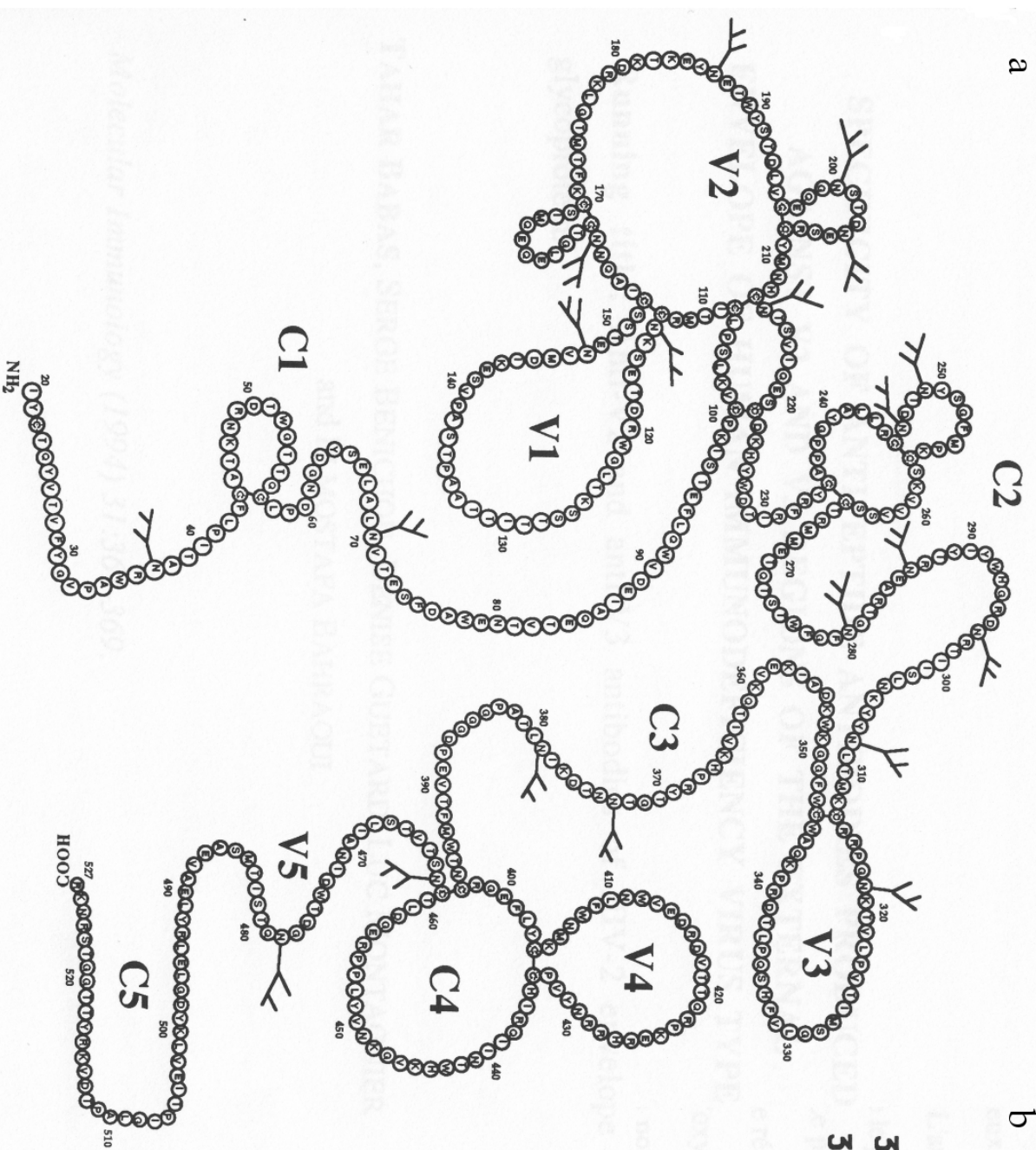


Figure 2

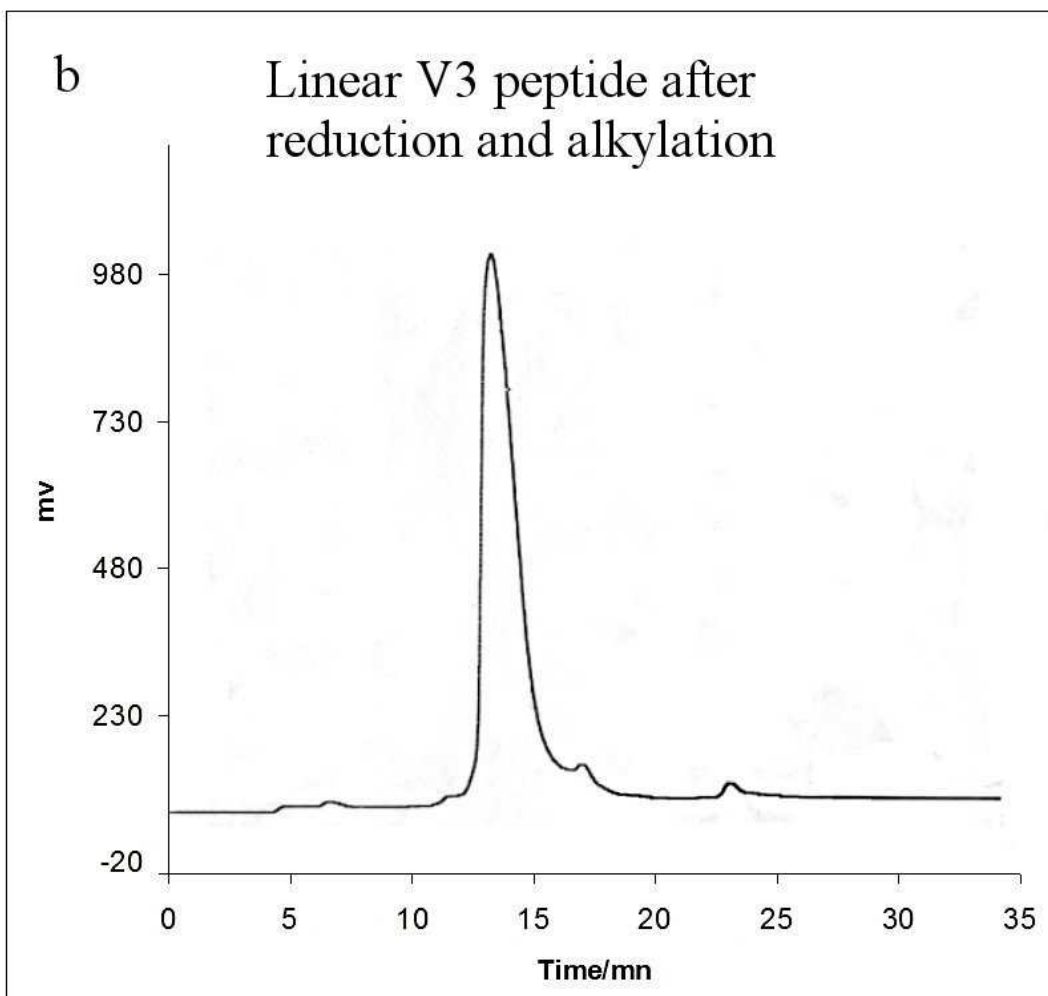
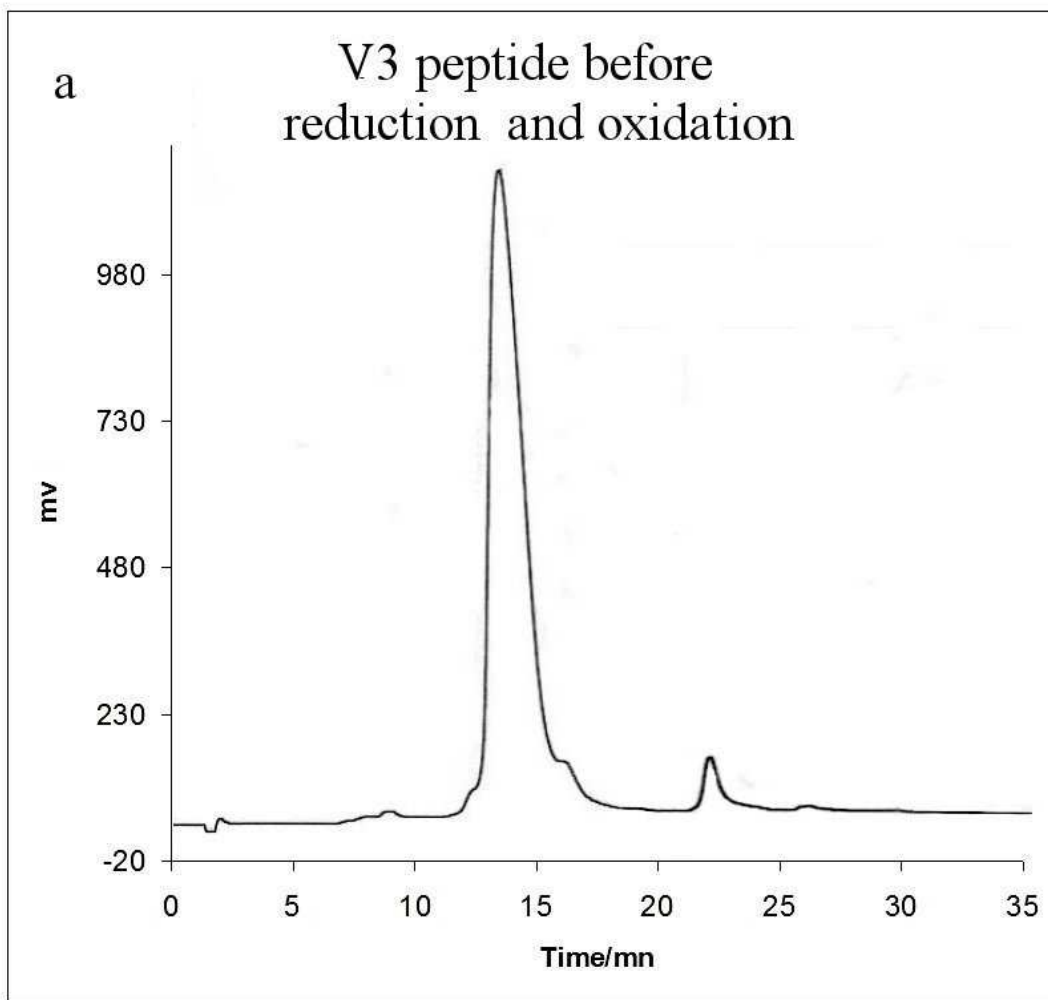


Figure 3

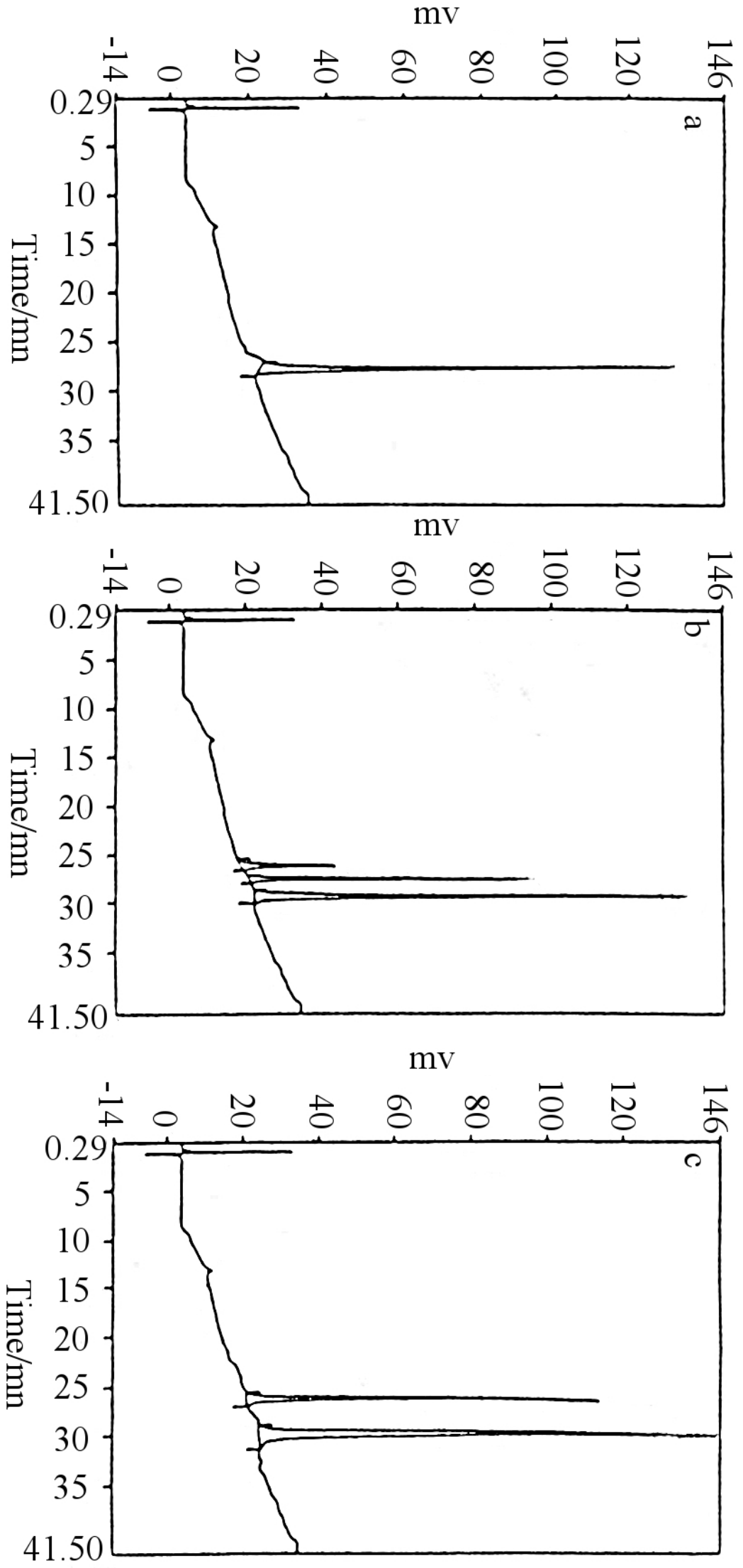


Figure 4

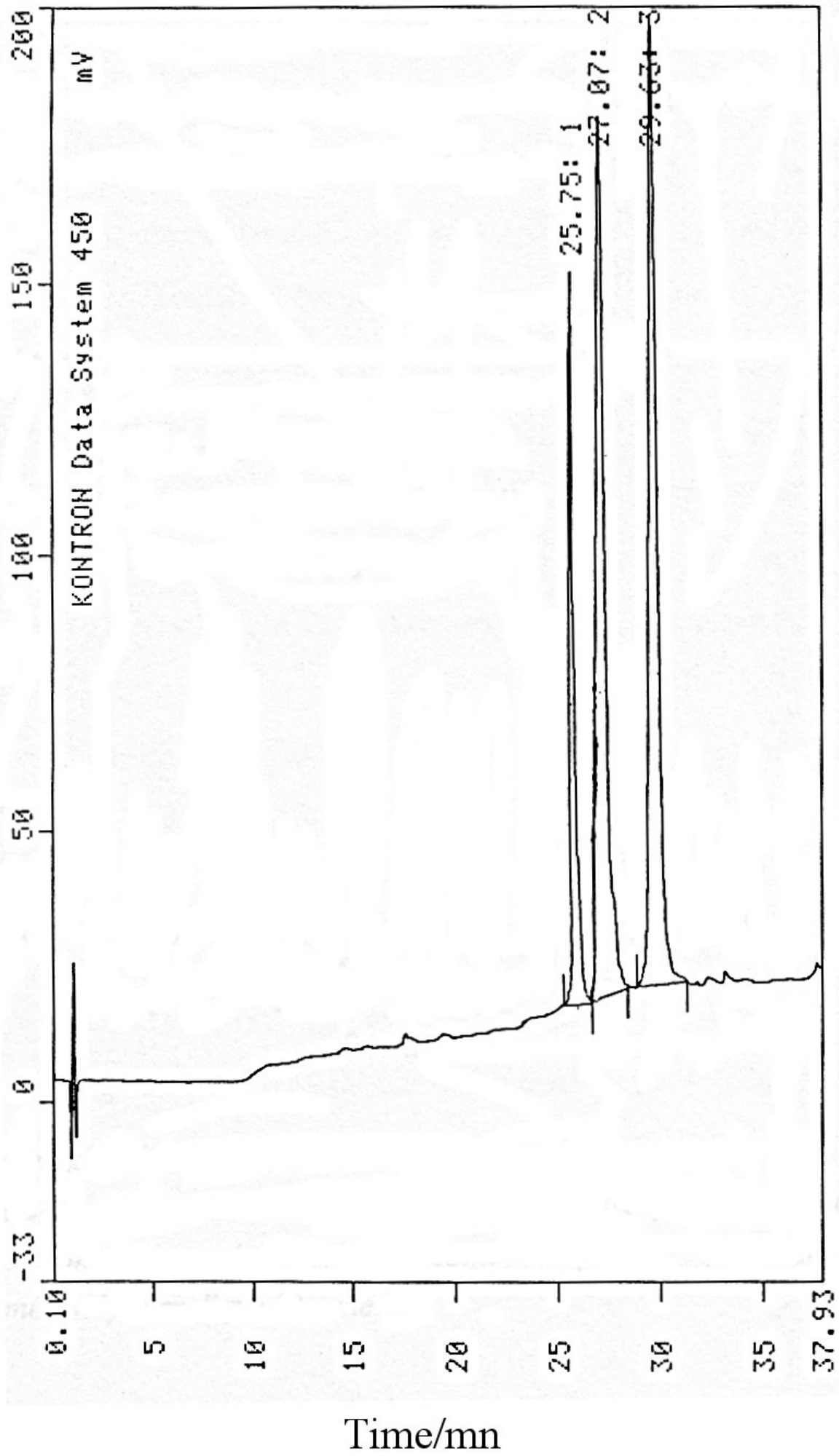


Figure 5

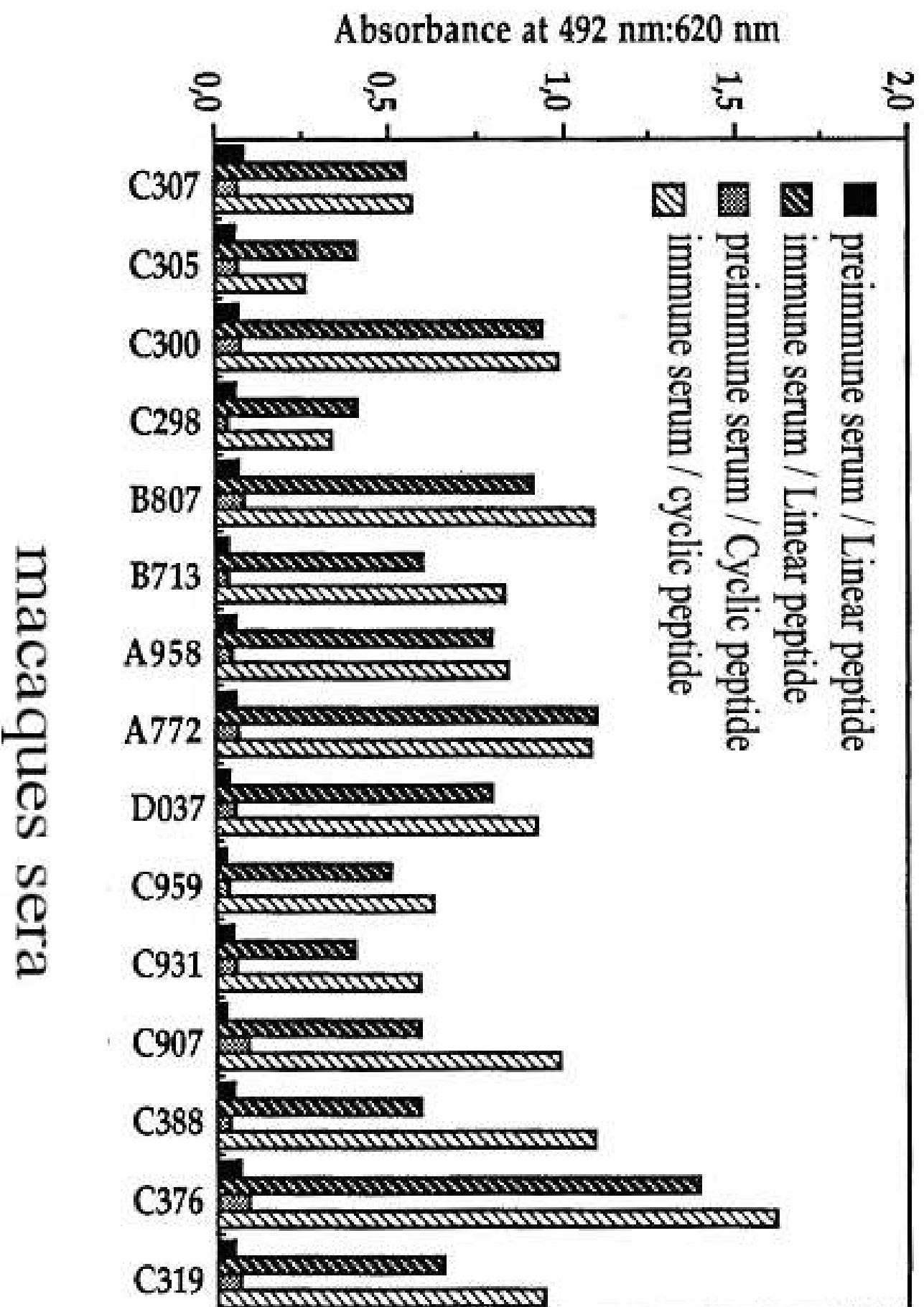


Figure 6

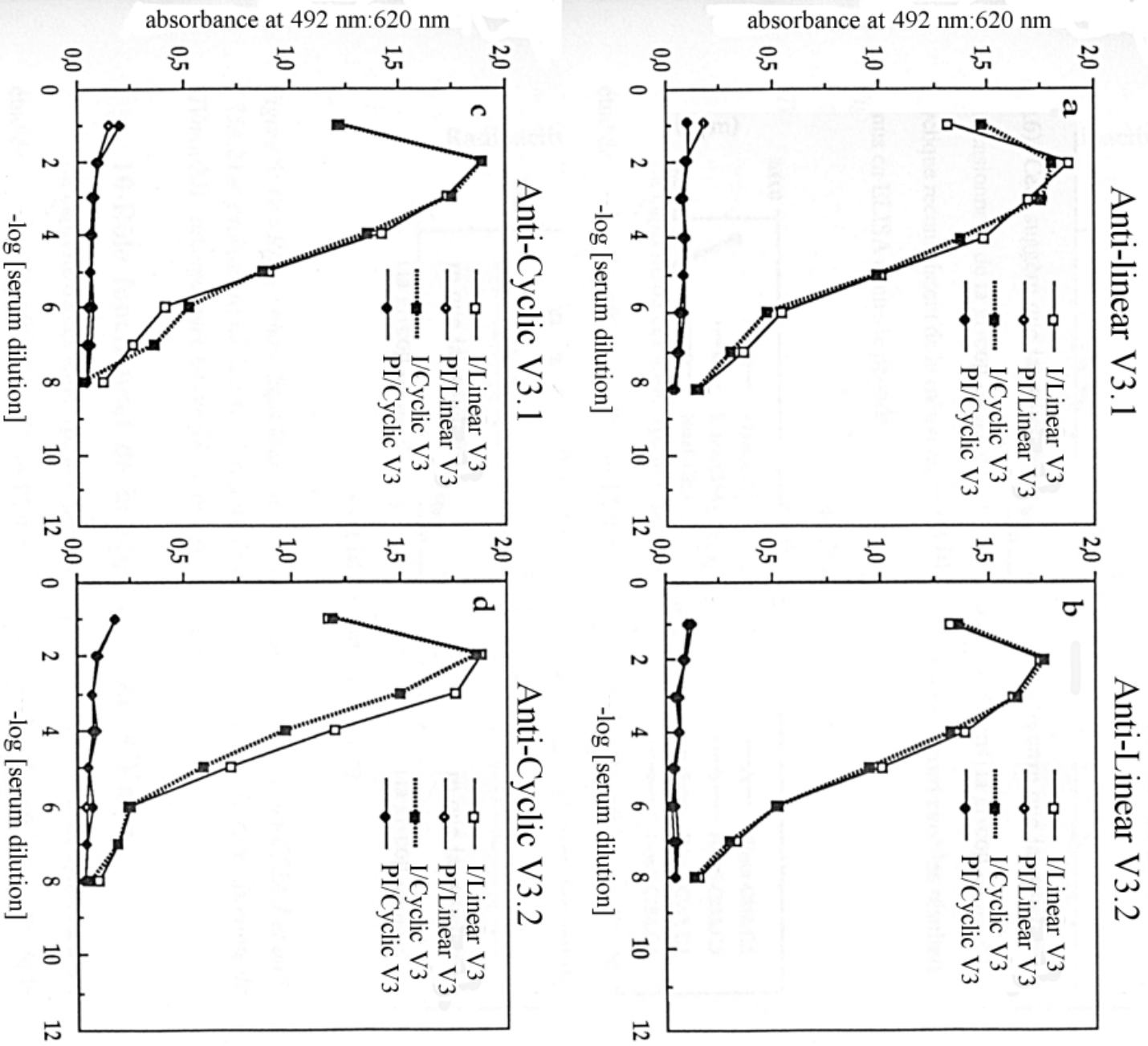


Figure 7

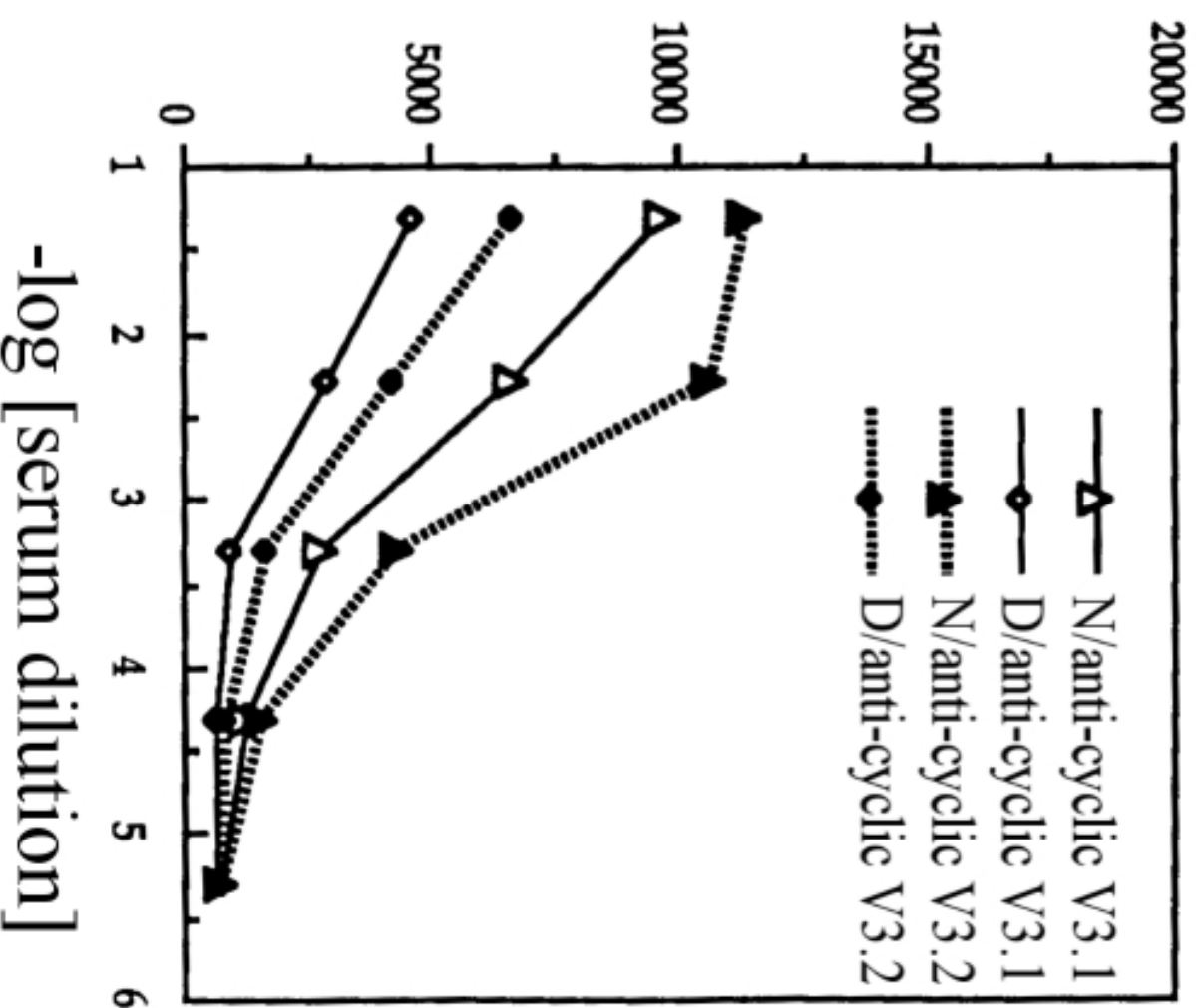
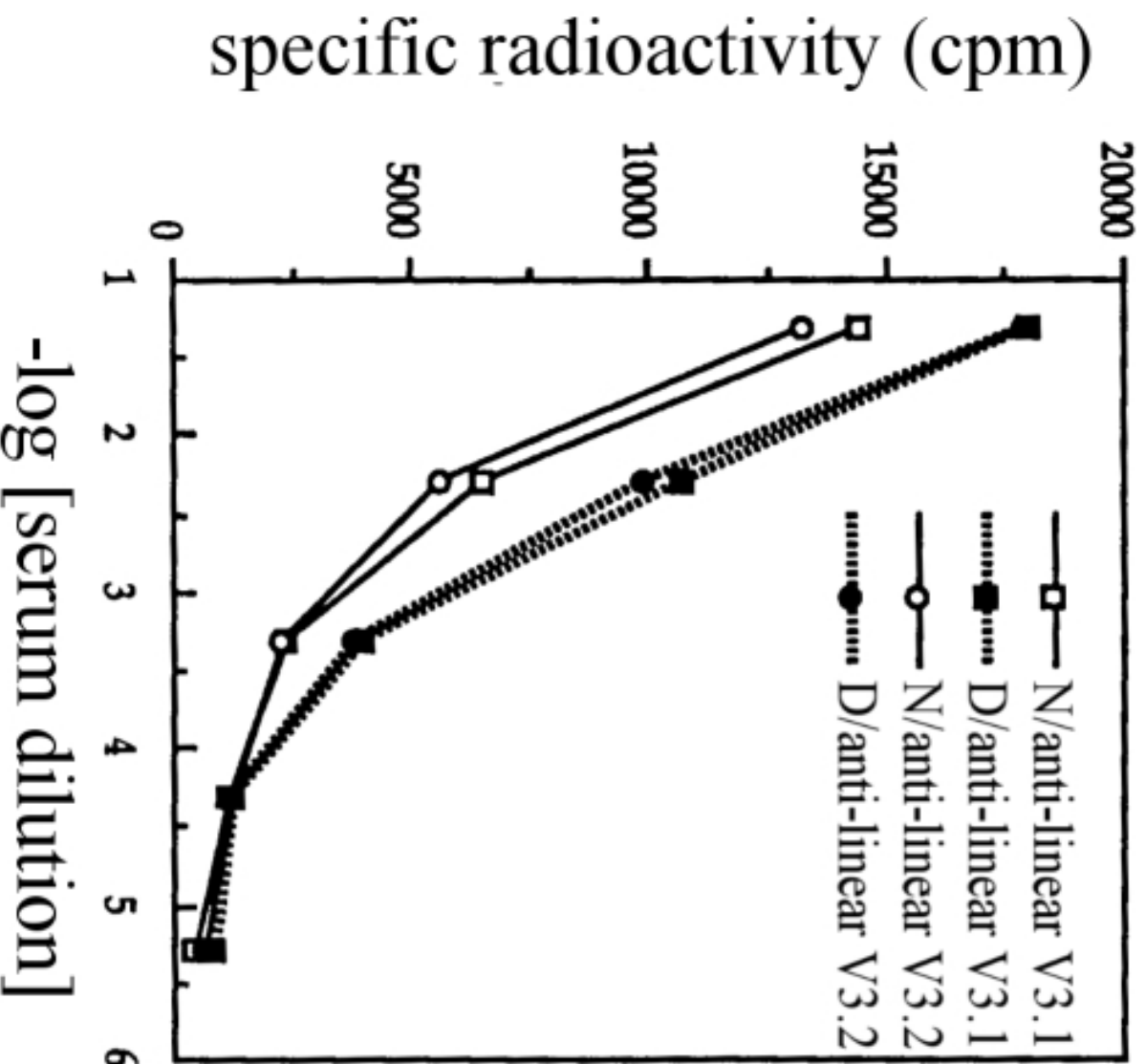
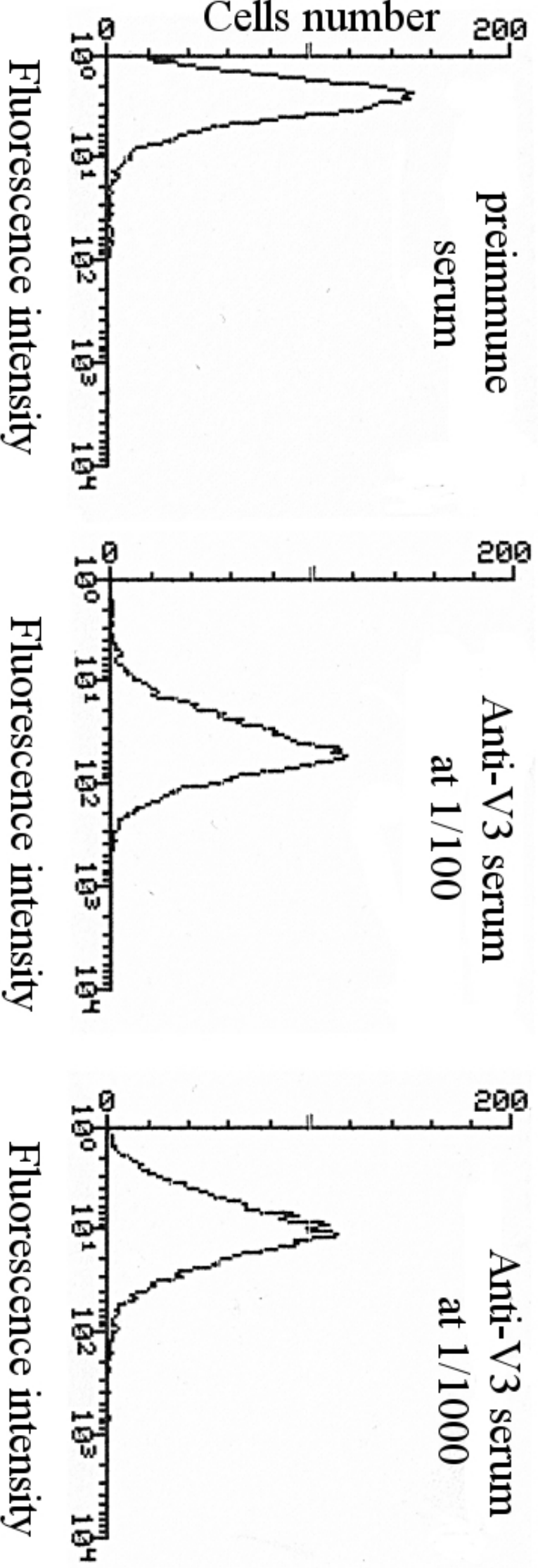


Figure 8



Article 4 manuscript

PKC-delta is required in human macrophages for completion of HIV-1 reverse transcription

Xavier Contreras, Fabrice Gaston, B. Matija Peterlin, Elmostafa Bahraoui

Soumis : Journal of Virology

Résumé de l'article

Les PKC jouent un rôle important au cours des différentes étapes du cycle de réplication du virus VIH-1. Dans cette étude, nous avons montré que l'inhibition de la PKC- δ par des inhibiteurs chimiques, des oligonucléotides antisens ou bien des PKC- δ dominant négatifs, bloque la réplication du VIH-1. L'inhibition de la PKC- δ n'affecte pas la formation du produit R/U5 lors de la transcription inverse mais bloque la synthèse des produits tardifs issus de cette transcription inverse. Ce résultat suggère que cette inhibition agit au niveau d'une étape précoce de la transcription inverse chez le macrophage. Nous avons montré que l'inhibition par la PKC- δ se traduit par le blocage de la formation des pseudopodes et des filaments d'actine qui sont nécessaires au bon déroulement de la transcription inverse. De plus, l'inhibition de la PKC- δ empêche l'association du complexe de transcription inverse avec le cytosquelette d'actine. Cette étude démontre l'importance de la PKC- δ au cours des premières étapes du cycle de réplication du VIH-1.

PKC-delta is required in human macrophages for completion of HIV-1 reverse transcription

Xavier Contreras, Fabrice Gaston, B. Matija Peterlin, Elmostafa Bahraoui

Abstract

PKCs play a critical role in HIV-1 replication at different steps of the viral life cycle. In these studies, we demonstrate that inhibition of the PKC-delta isozyme by chemical inhibitors as well as by antisense oligonucleotides and dominant negative PKC delta blocks the replication of HIV-1. Inhibition of PKC- δ does not affect formation of the HIV-1 reverse transcriptase product R/U5 but blocked the synthesis of later reverse transcription products demonstrating that this block occurs in human macrophages during early reverse transcription. Inhibition of PKC delta prevented the formation of pseudopodes and stress actin filaments that are required for the completion of reverse transcription. Additionally, inhibition of PKC delta prevented association of the complex of reverse transcription to the actin cytoskeleton. These studies highlight the importance of PKC delta in early steps of the viral life cycle of HIV in human macrophages.

Introduction

HIV-1 infection hijacks the cellular machinery and uses signalling pathways at its own advantage. These play a critical role at different steps of the viral life cycle beginning with the interaction between the viral glycoprotein gp120 and the CD4 receptor. This interaction leads to p56lck and other tyrosine kinase phosphorylations which in turn activate Raf/MEK/ERK, PI3K, and, indirectly, calcium pathways (Veillette, Bookman et al. 1989; Briand, Barbeau et al. 1997; Davis, Dikic et al. 1997; Popik, Alce et al. 2002). Additionally, the binding of gp120 with chemokine receptors CCR5 (for M-tropic strains) or CXCR4 (for T-tropic strains) activates G proteins which recruit adenylate cyclase, PYK2 and phospholipase C (PLC). PLC hydrolyzes membrane phosphoinositides (PIP₂) in inositol triphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG) which activate respectively the calcium and protein kinase C (PKC) pathways. All these signaling pathways regulate cell activation by acting on the state of cell differentiation, transcription activation, cell survival or cytoskeleton dynamics which are crucial for viral replication (Schubert, Schneider et al. 1992; Yang and Gabuzda 1998; Vita, Drakopoulou et al. 1999; Hassaine, Courcoul et al. 2001; Francois and Klotman 2003).

PKCs are serine/threonine kinases that have been classified into three groups on the basis of their structure and ability to bind co-factors. So far, 11 PKC isozymes have been described (Ron and Kazanietz 1999; Breitkreutz, Braiman-Wiksman et al. 2007). In addition to membrane phospholipids (phosphatidyl serine, PS), conventional PKC (cPKC) isozymes (α , β I, β II and γ) need calcium (Ca²⁺) and DAG. Novel PKC (nPKC) isozymes (δ , ϵ , θ , η , μ) only need DAG, phosphatidylserine (PS) and unsaturated fatty acids. Finally, atypical PKC (aPKC) isozymes (ζ and $\tilde{\iota}$ λ) may have some constitutive activity, but are also activated by PS, phosphatidylinositides or unsaturated fatty acids. The structure of PKC isozymes includes four conserved regions (C1–C4) and five variable regions (V1–V5) (Biswas, Ahlers et al. 1994). In the N-terminal region, the C1 domain contains two cysteine-rich regions responsible for the binding to DAG and a pseudo-substrate site. This site lacks the DAG binding domain in aPKC isozymes. The calcium binding site in the C2 domain, present only in cPKC isozymes, is necessary for PS binding. The C3 domain is an ATP binding site. Finally, the C4 domain contains the substrate binding site and the phosphate transfer region. PKC isozymes are present in the cytosol in an inactive conformation in which the pseudosubstrate site of the enzyme blocks the access to the substrate fixation site. Following a membrane signal, DAG, fatty acids, and kinases activate PKC isozymes and induce their translocation to the membrane. This cytoplasm-to-membrane translocation is used as an assay to identify PKC

isozyme activation. The PKC pathway is crucial for many cellular events and its involvement has been reported in the step of entry of a number of enveloped viruses like rhabdoviruses, alphaviruses and herpesviruses (Constantinescu, Cernescu et al. 1991). PKCs are also involved in the viral life cycle of non-enveloped viruses. It has, for example, been demonstrated that type 2 adenovirus entry is PKC-dependent. Indeed, when infection is performed in presence of calphostin, a conventional and novel PKC inhibitor, viral particles do not reach endosomes anymore and accumulate in the cytoplasm (Otaka, Nakamura et al. 2002). Additionally, influenza virus interaction with its receptor induces activation of the PKC pathway. Selective inhibition of PKC- β_{II} isozyme was accompanied by the blocking of viral infection which aborts following the block of viral trafficking at the level of late endosomes (Sieczkarski, Brown et al. 2003).

Activation of PKCs enhances HIV-1 gene expression in latently infected T-cells and in cell lines (Hu, Frank et al. 2004). Indeed, PKCs stimulate NF- κ B (Hamamoto, Matsuyama et al. 1990; Meichle, Schutze et al. 1990; Wei, Ghosh et al. 1995), via the phosphorylation of I κ B. NF- κ B binds to the HIV promoter and is involved in initiation and elongation of transcription (Nabel 2005). In addition, PKCs activate other transcription factors like AP-1 and NF-AT (Siekevitz, Josephs et al. 1987; Lamph, Wamsley et al. 1988) which have specific binding sites on the HIV-1 promoter. Moreover, PKCs have been suggested to phosphorylate a number of viral proteins such as p17gag (Burnette, Yu et al. 1993), Nef (Guy, Kieny et al. 1987; Guy, Riviere et al. 1990; Baur, Sass et al. 1997) and Rev (Malim, Hauber et al. 1989). They are also involved in cytoskeleton rearrangements required in human macrophages during the early steps of reverse transcription (Bukrinskaya, Brichacek et al. 1998). A number of reports have demonstrated the major role of PKC- δ in the maintenance of cytoskeleton integrity. Indeed, the C2 domain of PKC- δ contains an actin binding site. This binding could be involved in the redistribution of actin in neutrophils (Lopez-Lluch, Bird et al. 2001; Smallwood, Hausman et al. 2005). PKC- δ also plays a central role in differentiation of monocytes, resistant to infection by HIV-1 (Sonza, Maerz et al. 1996; Sonza, Mutimer et al. 2001), into macrophages, that are susceptible to infection (Fantuzzi, Conti et al. 2000; Weiden, Tanaka et al. 2000). Furthermore, macrophage differentiation induced by M-CSF (Mischak, Pierce et al. 1993; Junttila, Bourette et al. 2003) or by PMA (Mischak, Pierce et al. 1993; Tan, Liu et al. 1997) is dependent on PKC- δ . This is mainly because of its action on the NF- κ B transcription factor (Biswas, Ahlers et al. 1994; Kang, Park et al. 2004) and, maybe, because of its association to vimentin in the cytoskeleton (Owen, Johnson et al. 1996). PKC- α and β_I could also be involved in this differentiation (Kim, Gollapudi et al. 1996).

Cells from the monocyte/macrophage lineage play a crucial role in HIV-1 infection and pathogenesis. Macrophages are the main reservoir of HIV productive infection and sustain high virus loads after the peak of T-lymphocytes infection at least in rhesus macaques (Shibata, Igarashi et al. 1999). Indeed, 95% of the virus production in lymph nodes, spleen, gastrointestinal tract, liver and kidney are macrophages dependant. These cells have a long half-life when infected compared to lymphocytes since HIV-1 replication in these cells does not induce cytopathic effects (Embretson, Zupancic et al. 1993; Orenstein, Fox et al. 1997). All of these studies demonstrate that current therapies are not as efficient in macrophages as they are on lymphocytes (Llewellyn, Zioni et al. 2006). Macrophages are also important for HIV-1 transmission and dissemination (Hirsch, Sharkey et al. 1998). Finally, primo-infection is mostly carried out by CCR5, macrophage-tropic viruses. Thus macrophages are a primary target during the first steps of virus dissemination in the organism of infected individuals. Thus, better understanding HIV replication in macrophages and finding efficient therapeutics are a major challenge.

PKC- δ seems to play a crucial role in mechanisms favoring viral replication in one of the most important and least well targeted reservoir of HIV replication, the macrophage. In this work, we have characterized the effect of PKC- δ inhibition on the HIV-1 viral life cycle in human macrophages.

Materials and methods :

- Chemical inhibitors :

Ro31-8220, a PKC inhibitor, rottlerin, a PKC- δ inhibitor, and cytochalasin D have been obtained from calbiochem.

- Monocyte isolation and differentiation in macrophages :

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on a Ficoll density gradient from buffy coats issued from healthy non-infected donors and obtained at the blood transfusion center of Toulouse, Purpan. Monocytes were isolated by adherence, after a 45 minutes incubation in Iscove medium supplemented with human AB serum (10 %). Monocytes were then washed 3 times with HBSS and cultivated during 7 days in Iscove medium supplemented with 10 % Foetal Calf Serum (FCS), penicilline (100 units/ml) and streptomycin (100 pg/ml) at 37°C, 5 % CO₂, in a humid atmosphere so that macrophages can differentiate. M-CSF (10 ng/ml, Roche) was added on the first day of culture.

- Infection :

Macrophages, isolated as previously described in 24 well plates, were preincubated or not with chemical inhibitors and then incubated 3 h at 37°C in 250 μ l of Iscove medium 2 % FCS containing HIV-1 BaL (1 ng p24) per well, in absence or presence of the same inhibitors. After 2 washes with PBS, cells were cultivated in Iscove medium 10 % FCS. After 3 days, supernatants were harvested and tested for p24 presence with an ELISA kit (Pierce).

- Extraction of membrane and cytoplasmic proteins :

After treatment of macrophages with HIV-1 BaL, 1 ng p24, during 30 minutes or 1 h, macrophages ($2 \cdot 10^6$) were harvested and lysed at 4°C in 100 μ l of hypotonic buffer A (20 mM Tris HCl, 2mM EDTA, 1mM DTT, 10 μ g/ml leupeptin, 1mM PMSF ; pH 7,5) by repeated aspirations through syringe associated with a 21 Gauge needle. After the addition of 200 μ l of fresh buffer B (20 mM Tris HCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 μ g/ml de leupeptine, 1mM de PMSF, 0,33 M sucrose; pH 7,5), the lysate was centrifuged at 100,000 g, 4° C, for 40 min. The supernatant corresponding to the cytoplasmic fraction was collected; proteins were quantified by the Bradford assay and stored at -20°C. The pellet, corresponding to the

membrane fraction, was solubilised in 50 µl of fresh B buffer containing 1 % of Triton X-100, sonicated (1 min, power 2.5), and the amount of proteins quantified and stored at -20°C.

- Extraction of total proteins:

After macrophage treatment with HIV-1 BaL, 1 ng p24, during 30 minutes or 1h, macrophages ($2 \cdot 10^6$) were harvested, centrifuged, and the pellet lysed in 200 µl of PBS 1 % NP-40. The amount of proteins was quantified by the Bradford assay and then proteins were stored at -20°C.

- Western Blot :

Identical amounts of proteins (10 µg of cytoplasmic/membrane proteins) were separated on SDS-PAGE gel and then transferred on a nitrocellulose membrane. Immunoblotting was conducted by using either anti-PKC isozyme antibodies (anti-PKC- δ and anti PKC- β_{II}) at the 1/1000 dilution (Santa-Cruz biotechnologies). Membranes were saturated in Tris-buffered saline, 5 % milk, 0.05 % Tween 20 (TTBS) for 1 h, washed 4 times with TTBS, and incubated with the primary antibody for 2 h. Immuno-reactive bands were detected by 2 h incubation with secondary antibodies directed against rabbit immunoglobulins conjugated with peroxidase (1/1000) (DAKO A/S, Roskilde, Denmark). Bands were visualised after incubation of the membranes with a chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL).

- Vector production and transduction :

293T cells ($2.5 \cdot 10^6$) were cultivated on a 150 mm petri dish in DMEM 10 % FCS, penicilline streptomycine, supplemented with L-glutamine (2 mM) for 24 h. Cells were then cotransfected by the phosphate calcium method, with 30 µg of gag-pol plasmid coding for capsid proteins and HIV-1 enzymes, 10 µg of plasmid coding for the VSV-G envelope, and 40 µg of plasmids carrying the GFP reporter gene under the control of the CMV promoter and comprised between two LTR sequences so that it can be encapsidated. The medium is changed 10 h after cotransfection. Supernatant was harvested 72 h after cotransfection and centrifuged 15 min at 2500 rpm. Supernatant was filtered with a 0.22 µm filter and then ultracentrifuged 90 min at 50,000g. The pellet was finally resuspended in 100 µl PBS.

-Transduction :

Macrophages isolated as previously described in 24 well plates were preincubated or not with rottlerin and then incubated 3 h at 37°C in 250 µl of Iscove medium 2 % FCS containing 50 µl of VSV-G/GFP vector per well, in presence or not of inhibitors. After 2 washes with PBS, cells were cultivated in Iscove medium, 10 % FCS. After 2 days, cells were exposed to a UV ray during their observation under a fluorescence microscope.

- PCR :

5.10^5 macrophages / well in a 24-well plate were incubated for 3 h at 37°C in the presence of HIV-1 BaL virus (1 ng p24/ml) pretreated with DNase I. Cells were then washed with HBSS and Iscove medium, 10 % FCS, 1 % penicilline/streptomycine was added. Cells were then washed with HBSS at different times after infection. DNA was then extracted from these cells (Qiagen), and different amounts were analyzed by PCR (100, 200, 300 ng) in a total volume of 50 µl containing 5 µl of PCR buffer 10X (Hot Star; Qiagen), 1 µl of dNTP 10 nM (Invitrogen), 200 nM of sense and antisense primers, and 0.1 µl of Hot Star DNA polymerase (Qiagen). For U3/gag PCR, 1 µl of MgCl₂ (25 mM) was also added. For each PCR amplification, samples first undergo a 15 min denaturation step (72°C) followed by 40 amplification cycles and one step of 7 minutes elongation. The following primers were used for pol : 5-GCTGTCCCTGTAATAAACCCG-3 and 5-CCCTACAATCCCCAAAGTCAAGG-3 (nucléotides 4481 to 4501 and 4235 to 4257 of the DNA sequence of the HIV-1 BRU strain). Condition of PCRs include a denaturation step of 30 s at 92°C, a 1 min step of hybridisation at 50°C and a 1 min elongation step at 72°C. For U3/gag detection, we used primers described previously (42). PCR conditions for U3/gag include a 30 s denaturation step at 94°C, a 30 s hybridisation step at 55°C and a 1 min elongation step at 72°C.

- Actin cytoskeleton analysis :

Macrophages (5.10^5 cells/well) were resuspended and placed in wells containing a glass slide. After twice of adherence, macrophages were washed 2 times with PBS, and then fixed with PBS medium 3.7 % formaldehyde for 10 minutes at room temperature. After two more washes with PBS, macrophages were permeabilised by a 5 min incubation in the presence of 0.1 % TRITON X-100. Two washes with PBS were performed, then cells were incubated in presence of PBS 1 % BSA for 30 min to avoid non-specific labeling. Cells were then labeled with phalloidine-rhodamine (1U / well / 200 µl of PBS 1 % BSA, Molecular

Probes) for 20 minutes at room temperature. Macrophages were washed two more times with PBS and then mounted on cover slide using moviol and placed at 4°C until observation. Macrophages labeled with phalloidine-rhodamine were observed under a confocal microscope equipped with a 568 nm laser to excite the probe.

Results

PKC- δ plays a major role in HIV-1 BaL replication in macrophages

To determine the role of PKCs in viral replication, macrophages were then infected with the macrophage-tropic strain of HIV-1 BaL (1 ng p24/well) in the presence or absence of chemical inhibitors of PKCs. Viral replication was then assessed at day 3 post-infection using p24 ELISA (figure 1). Ro31-8220 (5 μ M), inhibitor of all PKC isozymes, strongly inhibits (94 %) viral replication (figure 1A). Interestingly, rottlerin (5 μ M), a PKC- δ isozyme inhibitor, almost totally blocks viral replication, whereas hispidin, a PKC- β inhibitor, used at 20 μ M, has no significant effect on HIV-1 BaL replication (figure 1A). These results suggest that PKC- δ plays a crucial role in the HIV-1 replication cycle in macrophages. Rottlerin had no detectable cytotoxicity as assessed by analyzing macrophages treated with rottlerin in a trypan blue exclusion assay. In addition, macrophages pretreated during 24 h with rottlerin (5 μ M), allowed, after washing and culture for 24 h, HIV-1 BaL replication in a similar manner compared to the one obtained in untreated macrophages (figure 1B and data not shown). To characterize further the specific involvement of PKC- δ , HeLa P4P5 cells expressing a dominant negative PKC- δ were infected with HIV-1 BaL (Data not shown). In these conditions, HIV replication was inhibited by 20 to 30 %. Strikingly, preincubation of HeLa cells with increasing concentrations of antisense oligonucleotides targeting PKC- δ completely blocked viral replication while sense oligonucleotides had no significant effects (figure 1C). Indeed in these conditions, PKC- δ expression was strongly suppressed by antisense but not sense oligonucleotides (figure 1D).

What about PKC- δ isozyme activation before and after interaction with HIV-1 BaL? We already know that, in unstimulated cells, PKC isozymes, in their inactive state, are essentially localized in the cytoplasm. However, following their activation, PKCs undergo conformational changes and are translocated to the membrane where they become activated. Taking into account this property, PKC- δ activation was evaluated by testing its presence in

cytoplasmic and membrane fractions issued from macrophages preincubated or not with the HIV-1 BaL virus. The results of this study, presented in figure 2, demonstrate that, following macrophages stimulation during 30 minutes with HIV-1 BaL (1 ng p24 / ml), PKC- δ was activated, as shown by its translocation to the membrane. In unstimulated cells, PKC- δ isozyme was present only in the cytoplasm. Similar results were obtained for PKC- β_{II} , only present in the cytosol of macrophages. PKC- β_{II} isozyme also translocated to the membrane fraction only after macrophages stimulation.

Taken together these results demonstrate a crucial role for PKC- δ in the viral replication of HIV-1 BaL. They also strongly suggest that the activation of this pathway is triggered following infection of human macrophages.

Inhibition of PKC- δ blocks HIV-1 BaL replication at a post-entry step

To determine the role of PKC- δ on the step of entry, we first measured the expression of the cell surface markers required for interaction with HIV-1: CD4 and CCR5 (figure 3A). Preincubation of macrophages with rottlerin (5 μ M) had no significant effect on the expression of both CD4 and CCR5 receptors. To test whether the HIV-1 entry step in macrophages was inhibited by rottlerin, we transduced macrophages with lentiviral vectors pseudotyped with the G glycoprotein of VSV or with the JR-FL CCR5 tropic gp120 envelope protein of HIV-1. In addition of its large tropism, the G protein of VSV mediates virus entry by endocytosis, unlike the HIV-1 envelope glycoprotein which mediates virus entry by fusion of viral and cellular membranes. Cells transduced by these vectors were analyzed by following expression of the GFP gene (Green Fluorescent Protein) contained in the vectors genome (see materials and methods). Macrophages were successfully transduced by both of these vectors. When the same experiments were performed in presence of rottlerin (1 μ M) (figure 3B), the number of GFP-positive cells was not significantly impaired for VSV-G pseudotyped vector. In contrast, it was greatly reduced for JR-FL pseudotyped vectors (90% inhibition). Thus, rottlerin seems to have a strong inhibitory effect on JR-FL but not VSV-G pseudotyped virions. These results demonstrate that the mode of entry modifies sensitivity to rottlerin. Indeed, both vectors have same reverse transcription, integration and genome expression but differ in their mechanism of entry. Previous studies have already suggested that entry via endocytosis bypasses the cytoplasm and may allow for the reverse transcriptase complex to be released in close proximity to the nucleus. Thus both mode of entry and early

steps of replication are impaired in VSV-G pseudotyped lentiviral vectors. To discriminate between these two possibilities, we assessed syncytia formation between HeLa P4P5 cells expressing CD4 and CCR5 receptors and HeLa cells expressing gp120/gp41 from the ADA macrophage-tropic strain. In these conditions, rottlerin did not block fusion of membranes (data not shown).

Inhibition of PKC- δ blocks viral replication at an early step, after initiation of reverse transcription

First, treatment of HeLa cells containing an LTR-luciferase construct with rottlerin did not induce a significant decrease of transcription from the HIV-LTR promoter. This result suggests that rottlerin action does not significantly influence transcription and production of viral particles (data not shown).

We thus analyzed the early steps of the virus life cycle that follow virus entry in macrophages. To this end, PCR analyzes were conducted, in order to detect viral DNA post-infection, with oligonucleotides specific for early (R-U5), intermediate (U3-R) and late (pol) reverse transcription products. Macrophages were harvested at different times post-infection (4 h, 12 h, 24 h et 48 h). PCR reactions were realised on DNA extracts obtained from these macrophages. At 4, 12, and 24 h, PCR amplification of R-U5 transcripts were obtained with DNA extracts from cells infected before and after rottlerin treatment. Early reverse transcription products were thus detected in both rottlerin pretreated macrophages and control macrophages (figure 4). These results indicate that this early step of reverse transcription is not blocked following PKC- δ inhibition by rottlerin. However, PCR amplifications of intermediate (U3-R) and late (pol) products of reverse transcription were not detected after rottlerin treatment. In control macrophages infected in the absence of inhibitor, a band was obtained at 12 and 24 h, and as expected, no amplification was observed at 4 h. These results suggest that preincubation of macrophages with rottlerin inhibits synthesis of intermediate and late products of reverse transcription.

At 48 h post-infection, the synthesis of all reverse transcription products was strongly inhibited following preincubation of macrophages with rottlerin, including early reverse transcription products (figure 4). Actually, the viral cycle is 24 h long. At 48 h, reverse transcription products corresponding to the first cycle of infection were mostly degraded and no virus could be produced. In control macrophages, however, a second cycle of replication could be achieved, amplifying the amount of products detected by PCR.

Overall, these results suggest that rottlerin inhibits viral replication at the level of reverse transcription. As interaction between the reverse transcription complex and actin cytoskeleton is necessary for viral DNA elongation during the reverse transcription step, we then analyzed effects of rottlerin on the actin cytoskeleton organization.

Inhibition of PKC- δ impairs the integrity of the actin cytoskeleton in human macrophages and prevents association of the incoming virus with actin.

Macrophages, preincubated or not during 24 h with rottlerin, were labelled with phalloidin, a specific ligand of F-actin (a component of actin microfilaments), coupled to a fluorescent probe, rhodamine. Labelled macrophages were then observed using confocal microscopy. Control macrophages presented a number of pseudopodes, projections of the cytoplasm towards the exterior of the cell which are the result of actin cytoskeleton rearrangements (figure 5A-D). In these untreated macrophages, like in all adherent cells, actin microfilaments organize in stress fibers (figure 5A, arrow). However, macrophages treated by rottlerin (5 μ M) 24 h before observation are composed of very few pseudopodes (figures 5E-H) and do not seem to contain stress fibers (figure 5E). Rottlerin, within range of the concentrations used in this study, has no significant effect on cell viability (figure 1 and data not shown). Thus, these data suggest that rottlerin interferes with actin cytoskeleton rearrangements in macrophages, thus inhibiting pseudopode formation.

Since the reverse-transcriptase complex from the incoming virus interacts with actin microfilaments (Campbell, Nunez et al. 2004), we hypothesized that inhibition of PKC delta could result in loss of association between this complex and actin cytoskeleton. To address this question, membrane, cytoskeleton and nucleus fractions were obtained from macrophages preincubated or not with rottlerin or cytochalasin D (CCD, a compound that disrupts actin cytoskeleton) and infected with HIV-1 BaL. Presence of the matrix protein (Gag-MA) was followed by western blotting. In control non-treated cells, Gag-MA was found in the membrane, cytoskeleton and nucleus fractions (Figure 6). As expected, Gag-MA was not found in the cytoskeleton and nucleus fractions following pre-treatment with CCD. Similar results were obtained after pre-treatment of cells with rottlerin. Taken together these results demonstrate that PKC- δ is required for cytoskeleton integrity in human macrophages and suggest that the reverse transcription complex is not able to associate with the cytoskeleton in these conditions.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that inhibition of PKC- δ blocks viral replication of HIV-1 BaL in human macrophages. This inhibition blocked replication at the level of early reverse transcription. In addition, receptors and co-receptors were expressed at normal levels and syncytia formation was not impaired, suggesting that there is no blockade at the level of virus entry. Inhibiting PKC- δ affected cytoskeleton integrity. Moreover, the complex of reverse transcription was not associated with the cytoskeleton after inhibition of PKC- δ . Thus, our studies strongly suggest that inhibition of PKC- δ disrupts the actin cytoskeleton and thus prevents completion of reverse transcription.

A virus pseudotyped with envelope glycoprotein G from VSV, penetrating by endocytosis, is not affected by rottlerin anymore. This PKC- δ inhibitor blocks reverse transcription after its step of initiation. Using cytochalasin D (CCD), an inhibitor of actin cytoskeleton dynamics, results in a similar block (Bukrinskaya, Brichacek et al. 1998; Iyengar, Hildreth et al. 1998). Infection of primary T lymphocytes by HIV-1 can be inhibited completely by CCD treatment. Colocalization of HIV-1 receptors, CD4 and CXCR4, on primary T lymphocytes requires actin. Actin could be necessary at the level of a step inducing fusion between cell and viral membranes. However, results of Bukrinskaya et al. clearly show that the inhibitory effects of CCD on T lymphocytes and Magi cells can only partially be involved in the inhibition of a step inducing the entry of the reverse transcription complex (Bukrinskaya, Brichacek et al. 1998). Additionally, we demonstrate that rottlerin has no significant effects on the expression of CD4 and CCR5 in human macrophages. These results indicate that the reverse transcription complex associates rapidly with actin microfilaments and that the efficiency of the reverse transcription is dependent upon the presence of actin microfilaments. These elements suggest that interaction with actin microfilaments is an intermediate step required for an efficient reverse transcription. Early reverse transcripts that would not achieve this step could still translocate to the nucleus but wouldn't be able to undergo a complete reverse transcription.

Cytoskeleton proteins are also involved in transcriptional activation of paramyxoviruses (measles virus, Sendai virus, respiratory syncytial virus (RSV)) and rhabdoviruses (VSV) (Moyer, Baker et al. 1986). For example, for paramyxoviruses like human parainfluenza virus type 3, polymerised actin has been shown to be required for activation of transcription from the ribonucleoprotein complex in vitro and in vivo (De,

Lesoon et al. 1991). It has been suggested that, following interaction with actin, ribonucleoprotein from paramyxovirus undergoes a conformational modification from a hypercondensed form to a less condensed form which could facilitate transcription (Benkirane, Friede et al. 1993). It is possible that activation of HIV-1 reverse transcription also requires a conformational change of the reverse transcriptase complex. This conformational change could be induced by interaction with actin microfilaments. Although there is no direct proof that the activation of the reverse transcriptase complex requires interaction with cytoskeleton, such a model is suggested by the discovery of interaction between the large sub-unit of the reverse transcriptase and actin (Hottiger, Gramatikoff et al. 1995). Alternatively, the process of decapsidation itself could facilitate association between the capsid core and the cytoskeleton because of the interaction between the capsid protein and actin. However, the results obtained by Bukrinskaya et al. would favor the first hypothesis since gagMA, contained within the reverse transcriptase complex is associated to actin whereas the capsid, main component of the virus core, would not interact significantly. The infectious viral particle does not contain all the components necessary to terminate cDNA synthesis, since only the products of the early reverse transcription are obtained in in vitro reverse transcription reactions, using viral extracts (Arts and Wainberg 1996). Thus, it is also possible that the cytoskeleton is a specialised site for reverse transcription since the cellular factors required to the process of reverse transcription could localize at the level of the actin cytoskeleton. Studies by Mc Donald et al., (McDonald, Vodicka et al. 2002), suggest that after entry into the cytoplasm, HIV-1 genome uses the actin cytoskeleton to move in peripheral regions of the cell. Actin could be used to access the microtubular network (Taunton 2001). The reverse transcription complex then associates to microtubules to get in close proximity to the nucleus. Recent studies found that the reverse transcription complex was also able to bind actin around the nucleus, before nuclear import (Arhel, Souquere-Besse et al. 2007). This step is followed by uncoating after formation of the DNA flap, upon completion of viral DNA synthesis.

Reverse transcription probably occurs in an integral capsid structure (Arhel, Souquere-Besse et al. 2007). Some morphological changes in the capsid may be involved in the process of reverse transcription, as suggested by the impaired reverse transcription observed in viruses with hyperstable capsids or unstable cores (Forshey, von Schwedler et al. 2002). It is thus possible that interaction with actin plays an important role in promoting correct stability of the viral core. In normal conditions, the transport of the viral core to the nucleus is more rapid than the RT. RT thus finished near the nuclear pores and triggers uncoating once the

DNAflap is synthesized. Most probably in the absence of actin cytoskeleton at both cell membrane and around the nucleus, the viral core can't be transported to the nuclear pore.

In support of our conclusions, activation of the actin polymerization nucleator Arp2/3 was demonstrated to be involved in the transport of the viral core from plasma membrane to the microtubule network (Komano, Miyauchi et al. 2004). Importantly, in agreement with our results, membrane fusion was not impaired and VSV-G pseudotyped vectors that use endosomes to enter cells were not affected by such treatment. This study suggested that cortical actin is actively remodeled by Arp2/3. In our studies, inhibition of PKC- δ impaired the integrity of the cytoskeleton, preventing such remodeling from occurring.

Rottlerin inhibits PKC- δ and PKCs are involved in cytoskeleton rearrangements and differentiation from monocyte to macrophage. PKC- δ would be capable to bind to the actin cytoskeleton in the neutrophil and induce its redistribution (Lopez-Lluch, Bird et al. 2001; Smallwood, Hausman et al. 2005). In the present studies, we demonstrated that rottlerin inhibits pseudopode formation in macrophages. These results suggest that, by inhibiting PKC- δ , rottlerin inhibits actin cytoskeleton and thus inhibits association of the complex of reverse transcription to the cytoskeleton, thus blocking reverse transcription. The fact that a virus entering by endocytosis and not by fusion is not blocked could be explained because the reverse transcription complex is released within close range to the nucleus after endocytosis thus bypassing the need for actin cytoskeleton. The matrix protein (gag MA) would be involved in these early events (Bukrinskaya, Brichacek et al. 1998; Kaushik and Ratner 2004). Function of this protein is dependent upon phosphorylation of serins -9 -67 -72 -77 (51) probably by a Nef associated kinase (Swingler, Gally et al. 1997). PKC δ could also play a role in phosphorylation of gag MA.

Figure legends

Figure 1 :

Involvement of PKCs in HIV-1 BaL replication in human macrophage.

(A) Macrophages ($5 \cdot 10^5$) were treated or not by Ro31-8220 (1, 2, 5 μ M), an inhibitor of all PKCs, or by selective inhibitors of certain PKC isozymes (Rottlerin (1, 5 μ M), PKC δ inhibitor, Hispidin (2, 20 μ M) PKC β inhibitor and Gö6976 (20, 40nM), (PKC α , β_I , and ∞ inhibitor) during 30 minutes before HIV-1 BaL infection (1 ng p24/ml) during 3 h. After 3 days culture supernatants were collected and viral replication assessed by the presence of p24 determined by ELISA. (B) Same experiment cells were preincubated with rottlerin for 24h and then culture in rottlerin free medium for 24h before infection to evaluate the cytotoxic effect of rottlerin. Error bars originate from 3 experiments with one donor. Results are representative of experiments achieved in three different donors. (C) HeLa cells were preincubated with sens or antisens PKC- δ (1, 5, 10 μ M) and infected with HIV-1 BaL (1ng p24 / ml) during 3 h. After 3 days culture supernatants were collected and viral replication assessed by the presence of p24 determined by ELISA. (D) HeLa cells incubated with sens or antisens PKC- δ (5, 15 μ M) were lysed and a western blot anti PKC- δ was performed on the cytoplasm and membrane proteins extracts.

Figure 2 :

Analysis of the activation of PKC isozymes after macrophage infection.

Macrophages ($5 \cdot 10^6$) were stimulated or not by HIV-1 BaL (1ng p24 / ml) for 30 minutes and PKC isozymes activation determined by analysis of PKC translocation to the membrane. Membrane (M) and cytoplasmic (C) proteins were extracted and separated by SDS-PAGE 10%. PKC- δ et β_{II} isozymes were visualised by chemiluminescence using specific antibodies for each isozyme. Homogeneity of protein extracts was controlled by amido black staining of membranes. Results are representative of three independent experiments.

Figure 3 :

Effect of rottlerin on the step of entry.

Macrophages ($5 \cdot 10^5$ /ml) were pretreated or not with rottlerin (5 μ M) (A) for 24h or (B) 2h. (A) Cells were then stained for CXCR4 or CCR5 and analyzed using FACS analysis. (B) Cells were then transduced with a VSV-G pseudotyped vector carrying a GFP reporter

plasmid. Two days later, cells were observed with a confocal microscope. Images are representative of three independent experiments.

Figure 4 :

Analysis of the products of reverse transcription by HIV-1 BaL in macrophages pretreated or not with rottlerin.

Macrophages ($5 \cdot 10^5$ cells/well) were pretreated by rottlerin ($5 \mu\text{M}$) for 30 minutes and then infected with HIV-1 BaL (1 ng p24) for 3 h at 37°C . Cells were then lysed at 4, 12, 24, 48 h after infection, and 100 ng of DNA were analyzed by PCR. Amplification of the early (R-U5), intermediate (pol) and late (U3-gag) products of reverse transcription was performed by PCR. PCR products were analyzed after electrophoresis in an agarose gel. Three independent experiments realised with macrophages from three different donors gave similar results. C : Control cells ; R : cells pretreated with rottlerin ; I : cells infected without pretreatment with rottlerin.

Figure 5 :

Actin cytoskeleton is altered by pretreatment of macrophages by rottlerin ($5\mu\text{M}$)

Human macrophages were treated for 24h by rottlerin ($5 \mu\text{M}$, E-F), or not treated (controls) (A-D) and then fixed with formaldehyde (3,7 %). Macrophages were then permeabilised with triton X-100 (0,2 %) and stained with rhodamine-phalloïdine before mounting using moviol. Preparations were then observed under a confocal microscope. Confocal images are representative of three independent experiments.

Figure 6 :

Macrophages ($5 \cdot 10^5/\text{ml}$) were pretreated or not with rottlerin or cytochalasin D and then infected with HIV-1 BaL (1ng p24). Membrane (M), Cytoskeleton (C) and Nucleus (N) fractions were obtained and presence of Gag-MA was assessed by Western Blotting.

References

1. Briand G, Barbeau B, Tremblay M. Binding of HIV-1 to its receptor induces tyrosine phosphorylation of several CD4-associated proteins, including the phosphatidylinositol 3-kinase. *Virology*. 1997;228:171-179.
2. Davis CB, Dikic I, Unutmaz D, et al. Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J Exp Med*. 1997;186:1793-1798.
3. Popik W, Hesselgesser JE, Pitha PM. Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway. *J Virol*. 1998;72:6406-6413.
4. Popik W, Pitha PM. Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 induces association of Lck and Raf-1 and activates Raf-1 by a Ras-independent pathway. *Mol Cell Biol*. 1996;16:6532-6541.
5. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Samelson LE, Bolen JB. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Nature*. 1989;338:257-259.
6. Francois F, Klotman ME. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates human immunodeficiency virus type 1 replication following viral entry in primary CD4+ T lymphocytes and macrophages. *J Virol*. 2003;77:2539-2549.
7. Hassaine G, Courcoul M, Bessou G, et al. The tyrosine kinase Hck is an inhibitor of HIV-1 replication counteracted by the viral vif protein. *J Biol Chem*. 2001;276:16885-16893.
8. Schubert U, Schneider T, Henklein P, et al. Human-immunodeficiency-virus-type-1-encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase II. *Eur J Biochem*. 1992;204:875-883.
9. Yang X, Chen Y, Gabuzda D. ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF-kappaB. *J Biol Chem*. 1999;274:27981-27988.
10. Yang X, Gabuzda D. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and regulates the HIV-1 Vif protein. *J Biol Chem*. 1998;273:29879-29887.
11. Yang X, Gabuzda D. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol*. 1999;73:3460-3466.
12. Ron D, Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *Faseb J*. 1999;13:1658-1676.
13. Breitkreutz D, Braiman-Wiksman L, Daum N, Denning MF, Tennenbaum T. Protein kinase C family: on the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007;133:793-808.
14. Biswas DK, Ahlers CM, Dezube BJ, Pardee AB. Pentoxifylline and other protein kinase C inhibitors down-regulate HIV-LTR NF-kappa B induced gene expression. *Mol Med*. 1994;1:31-43.
15. Constantinescu SN, Cernescu CD, Popescu LM. Effects of protein kinase C inhibitors on viral entry and infectivity. *FEBS Lett*. 1991;292:31-33.
16. Nakano MY, Boucke K, Suomalainen M, Stidwill RP, Greber UF. The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. *J Virol*. 2000;74:7085-7095.
17. Siczekarski SB, Brown HA, Whittaker GR. Role of protein kinase C betaII in influenza virus entry via late endosomes. *J Virol*. 2003;77:460-469.
18. Williams SA, Chen LF, Kwon H, et al. Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF-kappaB. *J Biol Chem*. 2004;279:42008-42017.
19. Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature*. 1990;344:678-682.

20. Hamamoto Y, Matsuyama T, Yamamoto N, Kobayashi N. Augmentation of cytotoxic effect of tumor necrosis factor on human immunodeficiency virus-infected cells by staurosporine, a potent protein kinase C inhibitor. *Cancer Res.* 1990;50:5287-5290.
21. Meichle A, Schutze S, Hensel G, Brunsing D, Kronke M. Protein kinase C-independent activation of nuclear factor kappa B by tumor necrosis factor. *J Biol Chem.* 1990;265:8339-8343.
22. Nabel G, Baltimore D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature.* 1987;326:711-713.
23. Lamph WW, Wamsley P, Sassone-Corsi P, Verma IM. Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature.* 1988;334:629-631.
24. Siekevitz M, Josephs SF, Dukovich M, Peffer N, Wong-Staal F, Greene WC. Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the trans-activator protein of HTLV-I. *Science.* 1987;238:1575-1578.
25. Burnette B, Yu G, Felsted RL. Phosphorylation of HIV-1 gag proteins by protein kinase C. *J Biol Chem.* 1993;268:8698-8703.
26. Guy B, Kieny MP, Riviere Y, et al. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature.* 1987;330:266-269.
27. Guy B, Riviere Y, Dott K, Regnault A, Kieny MP. Mutational analysis of the HIV nef protein. *Virology.* 1990;176:413-425.
28. Baur AS, Sass G, Laffert B, Willbold D, Cheng-Mayer C, Peterlin BM. The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase. *Immunity.* 1997;6:283-291.
29. Hauber J, Bouvier M, Malim MH, Cullen BR. Phosphorylation of the rev gene product of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 1988;62:4801-4804.
30. Bukrinskaya A, Brichacek B, Mann A, Stevenson M. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med.* 1998;188:2113-2125.
31. Lopez-Lluch G, Bird MM, Canas B, et al. Protein kinase C-delta C2-like domain is a binding site for actin and enables actin redistribution in neutrophils. *Biochem J.* 2001;357:39-47.
32. Smallwood ND, Hausman BS, Wang X, Liedtke CM. Involvement of NH2 terminus of PKC-delta in binding to F-actin during activation of Calu-3 airway epithelial NKCC1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288:C906-912.
33. Sonza S, Maerz A, Deacon N, Meanger J, Mills J, Crowe S. Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J Virol.* 1996;70:3863-3869.
34. Sonza S, Mutimer HP, Oelrichs R, et al. Monocytes harbour replication-competent, non-latent HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Aids.* 2001;15:17-22.
35. Fantuzzi L, Conti L, Gauzzi MC, et al. Regulation of chemokine/cytokine network during in vitro differentiation and HIV-1 infection of human monocytes: possible importance in the pathogenesis of AIDS. *J Leukoc Biol.* 2000;68:391-399.
36. Weiden M, Tanaka N, Qiao Y, et al. Differentiation of monocytes to macrophages switches the Mycobacterium tuberculosis effect on HIV-1 replication from stimulation to inhibition: modulation of interferon response and CCAAT/enhancer binding protein beta expression. *J Immunol.* 2000;165:2028-2039.
37. Junttila I, Bourette RP, Rohrschneider LR, Silvennoinen O. M-CSF induced differentiation of myeloid precursor cells involves activation of PKC-delta and expression of Pkare. *J Leukoc Biol.* 2003;73:281-288.
38. Mischak H, Pierce JH, Goodnight J, Kazanietz MG, Blumberg PM, Mushinski JF. Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C-alpha and -

- delta and not by protein kinase C-beta II, -epsilon, -zeta, and -eta. *J Biol Chem.* 1993;268:20110-20115.
39. Wang QJ, Acs P, Goodnight J, et al. The catalytic domain of protein kinase C-delta in reciprocal delta and epsilon chimeras mediates phorbol ester-induced macrophage differentiation of mouse promyelocytes. *J Biol Chem.* 1997;272:76-82.
 40. Kang HS, Park EK, Kim KH, et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB is induced by a rottlerin-sensitive and p38 MAP kinase-dependent pathway during monocyte differentiation. *Mol Cells.* 2004;17:438-445.
 41. Owen PJ, Johnson GD, Lord JM. Protein kinase C-delta associates with vimentin intermediate filaments in differentiated HL60 cells. *Exp Cell Res.* 1996;225:366-373.
 42. Kim CH, Gollapudi S, Kim A, Lee T, Gupta S. Role of protein kinase C-beta isozyme in activation of latent human immunodeficiency virus type 1 in promonocytic U1 cells by phorbol-12-myristate acetate. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1996;12:1361-1366.
 43. Igarashi T, Brown CR, Endo Y, et al. Macrophage are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+ T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:658-663.
 44. Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, et al. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature.* 1993;362:359-362.
 45. Orenstein JM, Fox C, Wahl SM. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science.* 1997;276:1857-1861.
 46. Llewellyn N, Zioni R, Zhu H, et al. Continued evolution of HIV-1 circulating in blood monocytes with antiretroviral therapy: genetic analysis of HIV-1 in monocytes and CD4+ T cells of patients with discontinued therapy. *J Leukoc Biol.* 2006;80:1118-1126.
 47. Hirsch VM, Sharkey ME, Brown CR, et al. Vpx is required for dissemination and pathogenesis of SIV(SM) PBj: evidence of macrophage-dependent viral amplification. *Nat Med.* 1998;4:1401-1408.
 48. Campbell EM, Nunez R, Hope TJ. Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol.* 2004;78:5745-5755.
 49. Iyengar S, Hildreth JE, Schwartz DH. Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells. *J Virol.* 1998;72:5251-5255.
 50. Moyer SA, Baker SC, Lessard JL. Tubulin: a factor necessary for the synthesis of both Sendai virus and vesicular stomatitis virus RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:5405-5409.
 51. De BP, Lesoon A, Banerjee AK. Human parainfluenza virus type 3 transcription in vitro: role of cellular actin in mRNA synthesis. *J Virol.* 1991;65:3268-3275.
 52. De BP, Burdsall AL, Banerjee AK. Role of cellular actin in human parainfluenza virus type 3 genome transcription. *J Biol Chem.* 1993;268:5703-5710.
 53. Hottiger M, Gramatikoff K, Georgiev O, Chaponnier C, Schaffner W, Hubscher U. The large subunit of HIV-1 reverse transcriptase interacts with beta-actin. *Nucleic Acids Res.* 1995;23:736-741.
 54. Arts EJ, Wainberg MA. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and early events in reverse transcription. *Adv Virus Res.* 1996;46:97-163.
 55. McDonald D, Vodicka MA, Lucero G, et al. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol.* 2002;159:441-452.
 56. Taunton J. Actin filament nucleation by endosomes, lysosomes and secretory vesicles. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:85-91.

57. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, et al. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *Embo J.* 2007;26:3025-3037.
58. Forshey BM, von Schwedler U, Sundquist WI, Aiken C. Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol.* 2002;76:5667-5677.
59. Komano J, Miyauchi K, Matsuda Z, Yamamoto N. Inhibiting the Arp2/3 complex limits infection of both intracellular mature vaccinia virus and primate lentiviruses. *Mol Biol Cell.* 2004;15:5197-5207.
60. Kaushik R, Ratner L. Role of human immunodeficiency virus type 1 matrix phosphorylation in an early postentry step of virus replication. *J Virol.* 2004;78:2319-2326.
61. Swingler S, Gallay P, Camaur D, Song J, Abo A, Trono D. The Nef protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances serine phosphorylation of the viral matrix. *J Virol.* 1997;71:4372-4377.
62. Antoni BA, Rabson AB, Kinter A, Bodkin M, Poli G. NF-kappa B-dependent and -independent pathways of HIV activation in a chronically infected T cell line. *Virology.* 1994;202:684-694.

Figure 1

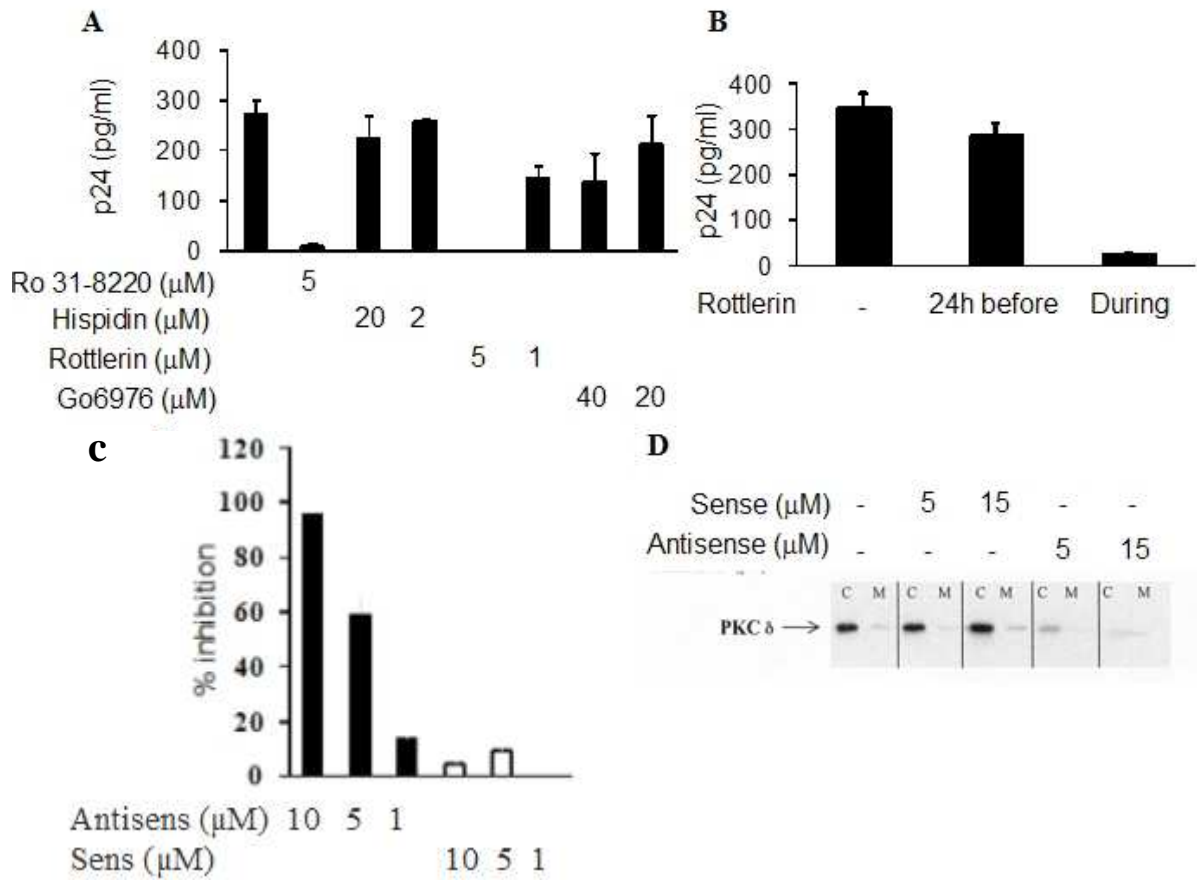


Figure 2

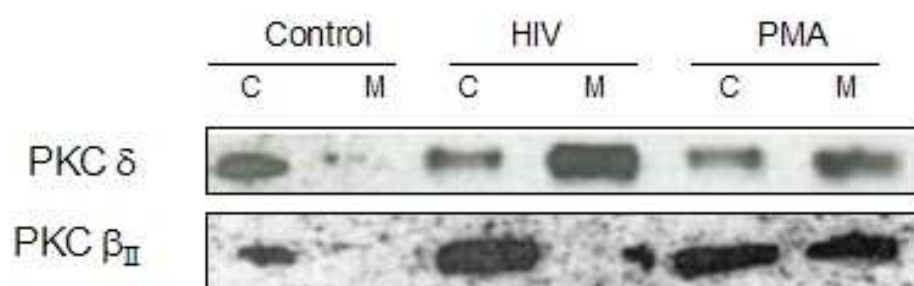
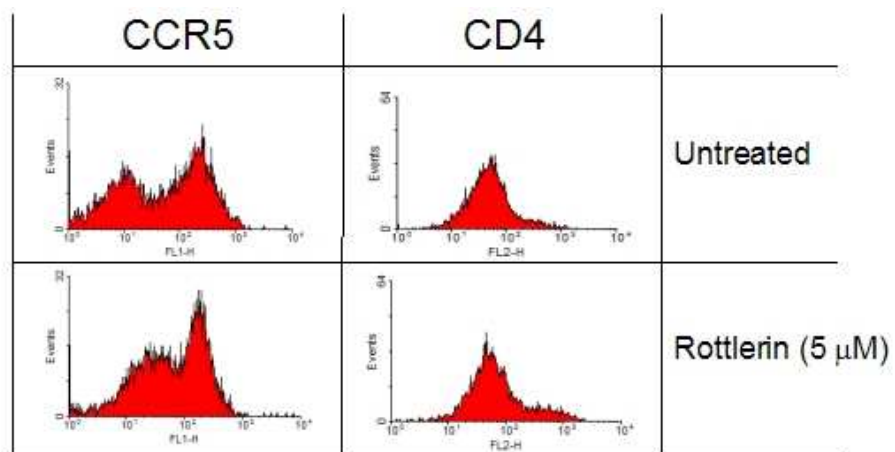


Figure 3
A



B

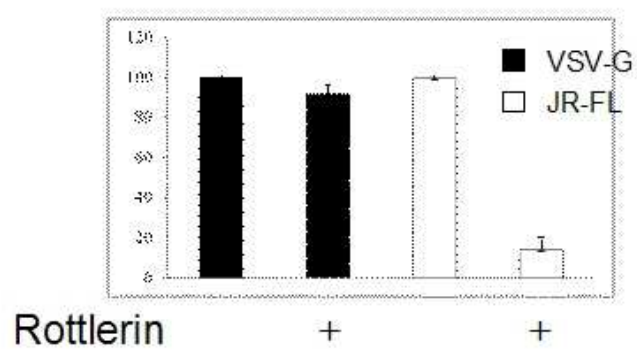


Figure 4

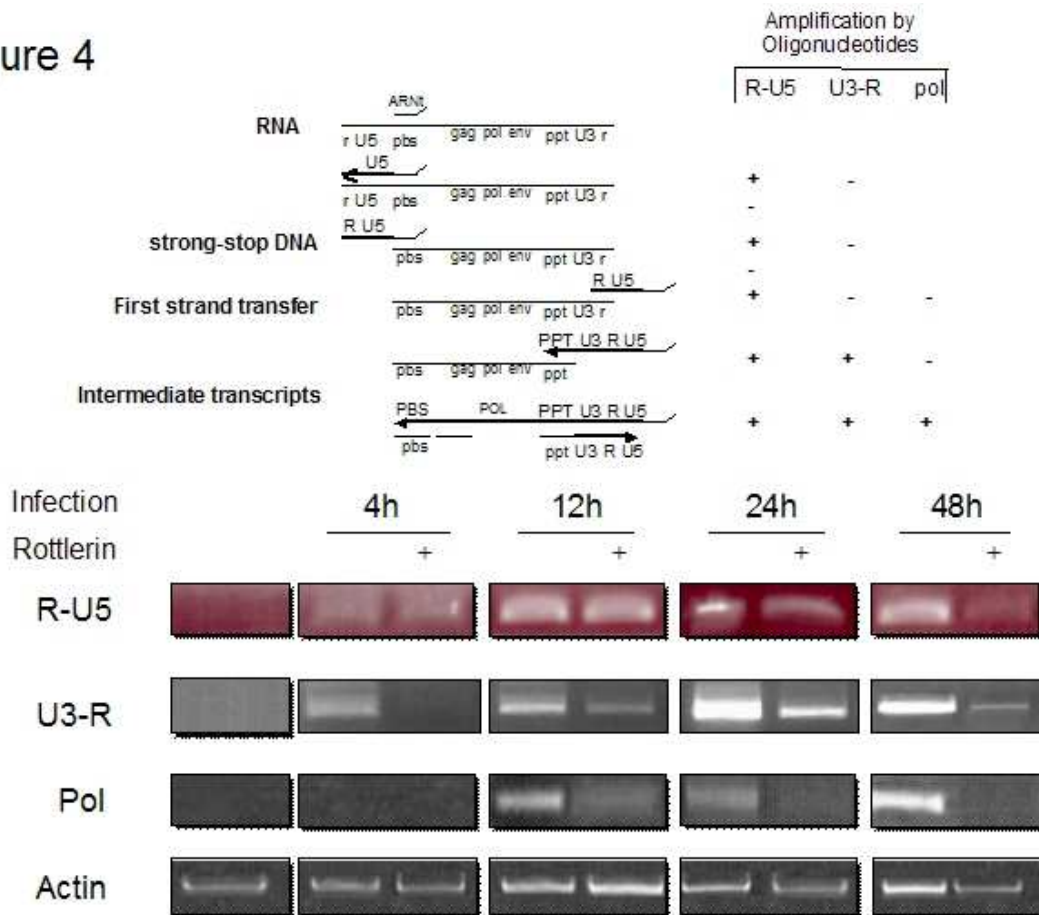
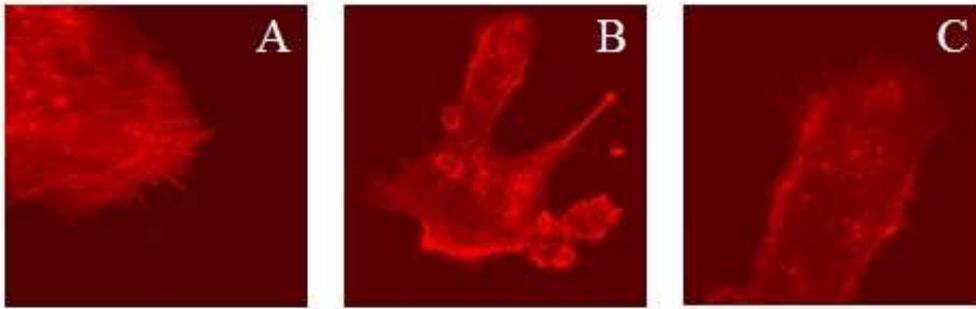


Figure 5

Control Macrophages



Pretreatment Rottlerin (5 μ M)

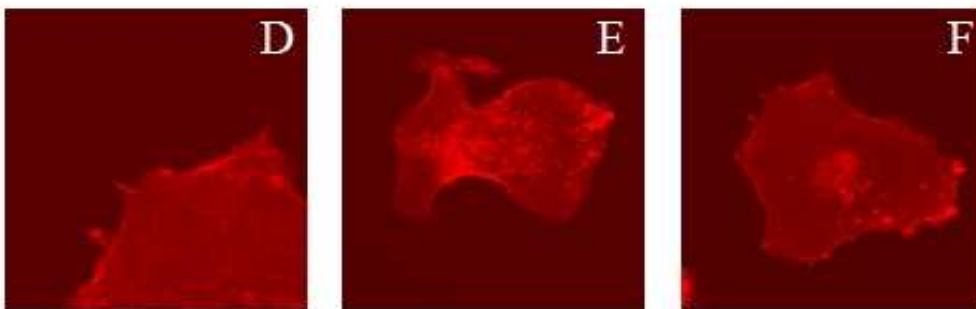
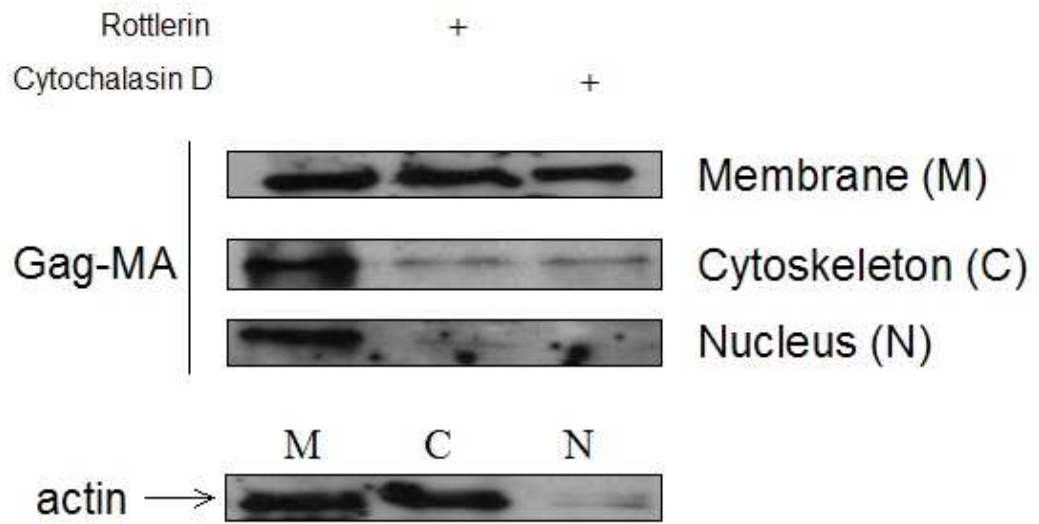


Figure 6



Annexe

Utilisation de vecteurs lentiviraux permettant l'expression de siRNA correspondant à la protéase virale du VIH-1

Les ARN interférants (siRNA) constituent un système mis en place par un organisme pour réguler l'expression de ses protéines et pour lutter contre les agents pathogènes tels les virus. Ce mécanisme, découvert chez les plantes, a permis d'envisager l'utilisation, comme outils, de ces ARN en biologie. Le fonctionnement de ce système d'interférence est relativement simple : un ARNdb complémentaire d'un ARN messager codant pour une protéine donnée est synthétisé ou introduit dans la cellule. Suivant le mécanisme décrit dans le chapitre I, cet ARN s'associe au complexe DICER pour donner de petits ARN simple brin qui s'apparient à l'ARN messager déclenchant ainsi sa dégradation par le complexe RISC (Stevenson 2003).

Ces ARN interférants représentent un intérêt particulier en biologie car ils permettent d'étudier le rôle de protéines en inhibant directement leur synthèse ou bien d'attribuer un rôle à un gène particulier (McManus and Sharp 2002). L'extinction de gène est une technique qui s'est rapidement développée avec la mise au point des petits ARN interférants. Ces siRNA offrent également des avantages importants en thérapeutique. En effet, le traitement de certaines maladies comme les cancers qui sont le résultat d'une prolifération anarchique de cellules peut être abordé par l'approche siRNA (Izquierdo 2005; Gartel and Kandel 2006; Putral, Gu et al. 2006).

Les siRNA sont également particulièrement intéressants dans la lutte contre les infections virales et notamment contre le VIH-1. En effet, le VIH-1 utilise de nombreuses protéines cellulaires et virales produites au sein de la cellule hôte afin d'assurer son cycle de réplication. Ces protéines constituent autant de cibles et leur expression peut-être inhibée par l'utilisation de siRNA spécifique de leur ARN respectif. De nombreuses études ont démontré l'efficacité de siRNA dirigés contre certaines de ces protéines comme Gag, Nef, Tat

(Capodici, Kariko et al. 2002; Novina, Murray et al. 2002; Qin, An et al. 2003; Song, Lee et al. 2003; Han, Wind-Rotolo et al. 2004).

Cependant, l'utilisation des siRNA comme traitement thérapeutique est soumise à plusieurs contraintes. En effet, si il est relativement facile de transfecter des lignées cellulaires avec des siRNA, cela devient beaucoup plus difficile sur des cellulaires primaires et en particulier *in vivo*. Afin de pouvoir délivrer les siRNA dans les cellules primaires, une technique basée sur l'utilisation de vecteurs rétroviraux a été mise au point. Les vecteurs rétroviraux sont des constructions basées sur la structure des rétrovirus mais qui sont délétés des protéines nécessaires à l'accomplissement d'un cycle viral infectieux, comme Tat, Rev et Nef (Delenda 2004).

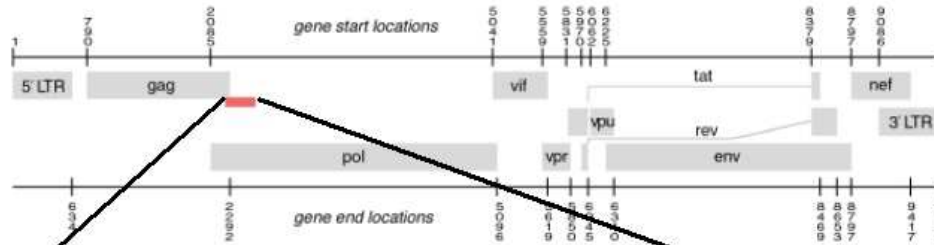
De nombreux travaux ont démontré l'efficacité de ces vecteurs dans la délivrance des siRNA et leur effet sur la réplication du VIH-1 (Qin, An et al. 2003; Humeau, Binder et al. 2004; Nishitsuji, Ikeda et al. 2004; Lee, Dykxhoorn et al. 2005; Mi, Zhang et al. 2005). Ces vecteurs présentent également un autre avantage qui réside dans l'utilisation du promoteur LTR sous la dépendance duquel seront placés les ADN codant pour les siRNA ou les protéines d'intérêt. Ceci est particulièrement important dans le cas du VIH, où, par exemple, seules les cellules infectées, et donc soumises à la présence de la protéine Tat, seront capables de produire les différents ARN.

Objectifs :

Le but de ce travail a consisté à développer des vecteurs lentiviraux contenant différentes séquences d'ADN de la protéase virale qui est essentielle pour la maturation de nombreuses protéines virales. Ces séquences d'ADN sont conçues de telle sorte qu'elles donneront, après intégration dans le génome cellulaire et activation par la protéine Tat, des siRNA spécifiques de la protéase virale entraînant le blocage de son expression dans la cellule. L'absence de la protéase virale lors du cycle cellulaire ne bloquera ni l'assemblage ni le bourgeonnement de nouvelles particules virales, mais, l'absence de maturation des protéines de structure entraînera une perte d'infectiosité de ces particules.

Pour cela, nous avons sélectionné plusieurs séquences localisées sur le gène de la protéase virale de l'isolat Lai et qui sont très conservées entre les différents isolats de VIH (figure 1). Comme contrôle pour tester l'effet inhibiteur des séquences choisies, nous avons également sélectionné une séquence correspondant à la protéine p24 de HXB2.

Figure 1 : Présentation des séquences choisies sur le gène *pol* pour la construction des vecteurs siRNA.



2254 CTCAGATCACTCTTTGGCAGCGACCCCTCGTCACAATAAAGATAGGGGGGCAATTAAGGAA
 GCTCTATTA GATACAGGAGCAGATGAT ACAGTATTAGAAGAAATGAATTT GCCAGGAAGA
 TGGAAACCAAAAAT GATAGGGGGAATTGGAGG TTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGA
 TACTCATAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTC
AACATA ATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTTAAATTTT 2549

<u>Séquence 1</u>	<u>AGATACAGGAGCAGATGAT</u>	1
<u>Séquence 2</u>	<u>AGTAGGACCTACACCTGTCA</u>	2
<u>Séquence 3</u>	<u>ACCTACACCTGTCAACATAA</u>	3
<u>Séquence 4</u>	<u>TGATAGGGGGAATTGGAGGT</u>	4

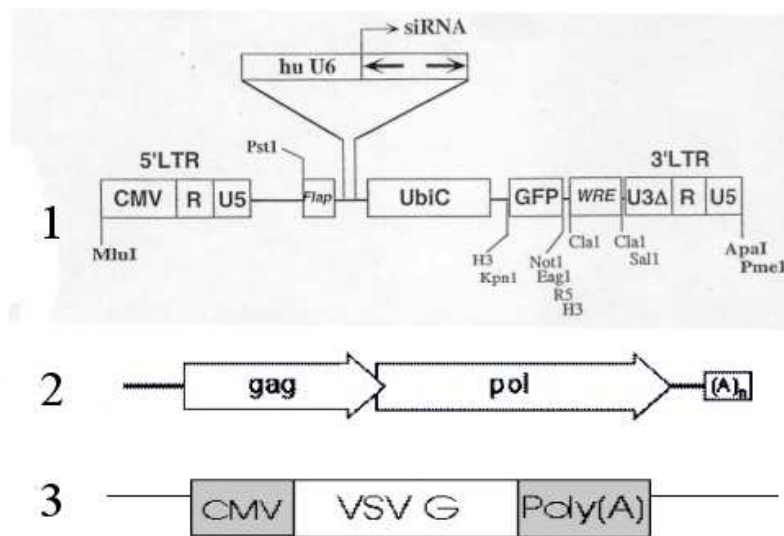
Contrôle: GATTGTACTGAGAGACAG p24

Construction des vecteurs

Ces différentes séquences sont clonées dans un vecteur pBShU6 (comprenant la séquence hU6 de la polymérase III) (Qin, An et al. 2003) puis la séquence comprenant ce domaine hU6 associée à l'ADN des différentes séquences est clonée dans le vecteur FG12 (Qin, An et al. 2003). FG12 est un vecteur contenant un LTR en 5' sous le contrôle d'un promoteur CMV, un LTR en 3' ainsi que le gène de la GFP qui servira de gène rapporteur.

Une fois cette étape réalisée et les différents clones obtenus sont contrôlés par observation de la fluorescence. Ensuite, les vecteurs contenant les différentes séquences sont co-transfectés avec un vecteur contenant les gènes *gag-pol* et un vecteur contenant la protéine G du virus VSV sous le contrôle d'un promoteur CMV dans des cellules HeLa P4P5 (Figure 2).

Figure 2 : Présentation des différents vecteurs servant à cotransfecter les cellules cibles.



L'efficacité de transfection est mesurée en évaluant le pourcentage des cellules HeLaP4P5 fluorescentes 24 h après la transfection. Soixante douze heures post- transfection, le milieu de culture est prélevé et centrifugé à 24000 g durant 90 min. Les « virus » récoltés sont ensuite aliquotés et titrés par ELISA p24.

Transduction des cellules cibles

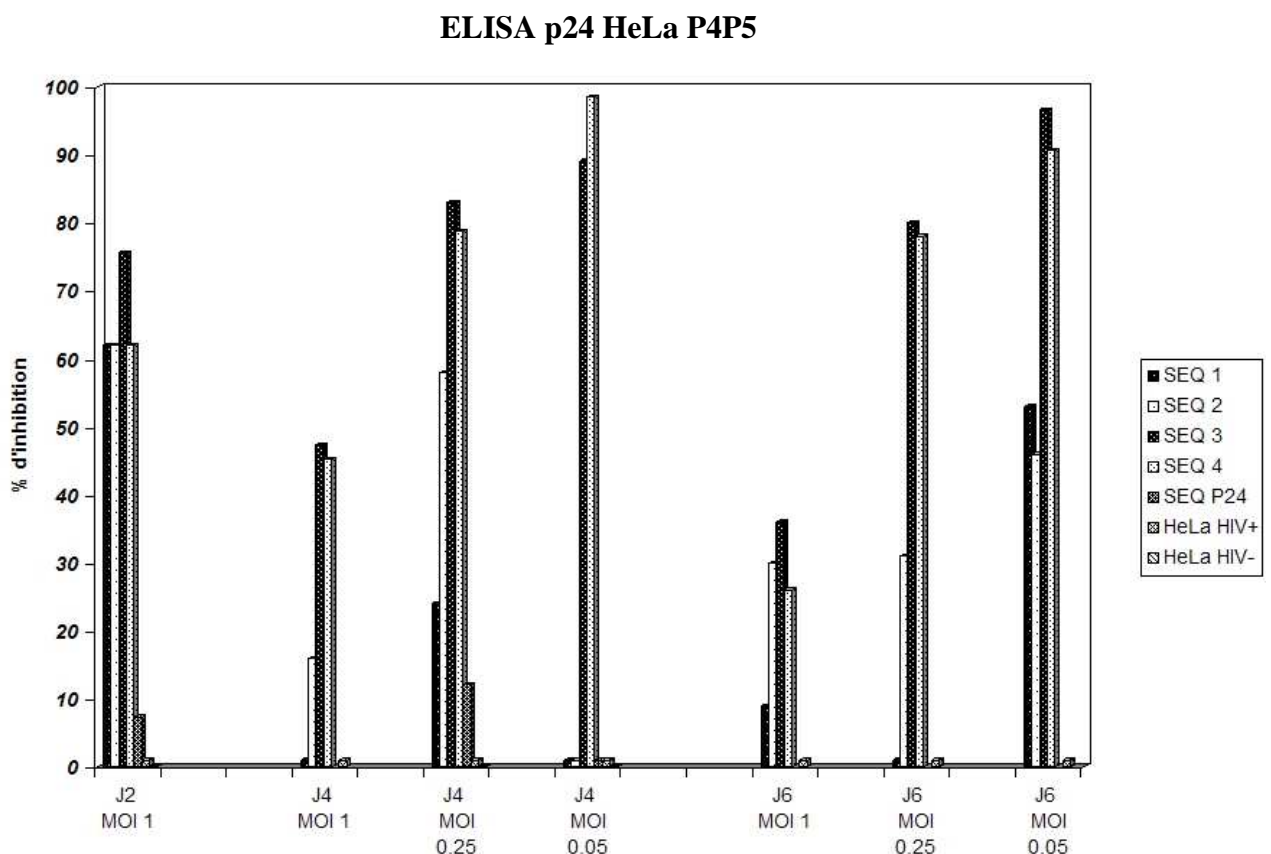
Les cellules HeLa P4P5 sont transduites avec les vecteurs lentiviraux selon le protocole suivant : 100000 HeLa P4P5 sont disposées dans un puits de plaque 96 puits en présence de 30 µl de vecteur, 70 µl DMEM 1,5 % SVF et 8 µg/ml de polybrène durant 3 h à 37 °C. Après 3 h, 150 µl de DMEM 20% SVF sont ajoutés dans le puits durant 12 h à 37 °C.

Le milieu est ensuite changé et la fluorescence est observée 48 h post-transduction au microscope à épifluorescence.

Infection des cellules transduites :

Après vérification de la transduction des cellules HeLa par observation de la fluorescence et lavage pour éliminer toute trace de vecteur, ces cellules sont infectées par le virus VIH-1 Lai 48 h après la transduction. Après 3 h d'infection, le surnageant est retiré et les cellules lavées plusieurs fois pour éliminer toute particule virale ne s'étant pas fixée sur les cellules. Un test P24 est également effectué sur le surnageant pour vérifier l'absence de la protéine. Différentes concentrations de virus sont utilisées (MOI 0,25 ; 0,5 et 1) et un test ELISA p24 est réalisé à 48, 96 et 144 h post infection (figure 3) afin de mesurer la quantité de p24.

Figure 4 : Test ELISA p24 sur les cellules HeLa P4P5 transformées pour exprimer des siRNA dirigés contre la protéase virale ou p24.



D'après ce test, on peut constater que les cellules transformées pour les différentes séquences codant pour la protéase présentent un profil de sensibilité différent suivant la séquence choisie. Les séquences 2 et 4 semblent être celles qui ont le plus fort pouvoir inhibiteur sur la production de p24. Les séquences 2 et 4 sont particulièrement intéressantes, en effet, elles inhibent à plus de 80% la réplication virale pour une MOI de 0,25 6 jours après l'infection et quasiment à 100 % pour une MOI de 0,25. En revanche, malgré une transduction efficace, la séquence siRNA p24 ne semble pas inhiber son expression ce qui peut éventuellement s'expliquer par un défaut d'expression de la séquence de siRNA.

Transduction de cellules primaires

Ces vecteurs lentiviraux ont ensuite été utilisés pour transduire des cellules primaires comme les macrophages. Suivant un protocole similaire à celui utilisé pour les lignées, les macrophages isolés à partir d'une poche de sang (article 1) ont été transduits par les différents vecteurs. L'observation au microscope a révélé que cette transformation était relativement peu efficace. En effet un maximum de 20 à 30% de cellules présente une fluorescence. Ce faible taux de transduction est insuffisant pour expérimenter son effet sur la réplication virale. En effet, il faudrait se placer à des MOI extrêmement basses pour que le nombre de particules virales ne soit pas en excès et avec 80 % de cellules non transduites l'effet de la transduction passerait inaperçu.

Une amélioration du rendement de cette transduction est donc nécessaire pour poursuivre cette expérimentation.

L'utilisation de vecteurs lentiviraux pour la transduction de siRNA dans les cellules cibles du VIH-1 est une technique particulièrement intéressante. Elle permet la transduction de cellules primaires et l'expression des siRNA peut être ciblée pour n'être exprimés uniquement dans les cellules qui serviront de cible au virus. Cependant, cette technique présente également des limitations de plusieurs ordres. Une première limitation concerne directement le transfert de matériel ADN dans le génome. En effet ce dernier, en s'intégrant dans le génome de la cellule hôte peut avoir des conséquences dramatiques si cette intégration

a lieu dans une zone sensible pouvant activer certains oncogènes entraînant ainsi l'apparition de cancers (Brenner and Malech 2003). D'autres limitations concernent l'utilisation des vecteurs. Ces vecteurs contiennent en effet plusieurs gènes viraux et la probabilité d'apparition de recombinaisons aboutissant à l'obtention de virus infectieux est un risque qu'il ne faut pas négliger. Enfin, concernant plus particulièrement le VIH-1, des travaux récents ont montré que la protéine Tat du virus, en se fixant sur le complexe DICER, pouvait inhiber son activité, court-circuitant ainsi le système des siRNA (Bennasser, Le et al. 2005; Bennasser, Yeung et al. 2006). Cependant, d'autres études sont nécessaires avant d'abandonner cette technique qui garde, par ailleurs, tout son intérêt dans le traitement thérapeutique de cancer ou de maladies auto-immunes.

DISCUSSION

La première étape du cycle viral des virus VIH et VIS est initiée par l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe virale gp120 avec le récepteur CD4 (Klatzmann, McDougal et al. 1990) et les corécepteurs CCR5 ou CXCR4. Plusieurs événements se déroulent par la suite, incluant des changements de conformation des glycoprotéines d'enveloppe gp120/gp41 et des transductions de signaux activant différentes voies de signalisation dont la voie PKC, avant d'aboutir à l'entrée du virus et sa réplication dans la cellule hôte. Le blocage de chacune de ces étapes constitue une cible potentielle pour le développement d'antirétroviraux efficaces.

Les résultats les plus avancés ayant abouti à l'utilisation d'un inhibiteur de l'entrée du virus comme application thérapeutique chez l'homme, concernent le blocage des réarrangements de l'ectodomaine de la gp41 par le peptide T-20 (Kilby, Hopkins et al. 1998; Kliger, Gallo et al. 2001; Matthews, Salgo et al. 2004).

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés :

1/ Au développement de peptides analogues de la région HRII dont l'objectif est d'obtenir une molécule possédant les avantages antiviraux du T-20 mais sans ses limitations que sont sa faible demi-vie et l'émergence de résistance virale. Cette étude étant le sujet principal de la thèse, elle constituera l'essentiel de la discussion.

2/ A comprendre l'impact de la réponse anticorps anti-T-20 chez les patients sous traitement. En effet, les anticorps anti-peptide peuvent agir de manière négative en neutralisant le peptide, diminuant encore plus sa demi-vie et son efficacité thérapeutique.

En parallèle, nous avons étudié l'immunogénicité et l'antigénicité de la boucle V3 de VIS afin de savoir si elles sont comparables à celles de la boucle V3 de VIH-1.

Nos résultats semblent montrer que les anticorps produits contre le peptide C34, *in vitro*, agissent en neutralisant sa capacité inhibitrice.

Concernant l'étude de l'immunogénicité de la région V3 de VIS, nos résultats montrent que, contrairement à ce qui est observé pour la boucle V3 de VIH-1, les anticorps produits contre la région V3 de VIS synthétisée sous forme cyclique ou linéaire, sont incapables de neutraliser le virus VIS *in vitro*. Les travaux réalisés avec la gp120 de VIH-1 montrent que, suite à l'interaction de la gp120 avec le récepteur CD4, la région V3 subit des modifications de structures lui permettant d'interagir avec les corécepteurs CCR5 (Moore and Nara 1991; Moore and Binley 1998). Un tel mécanisme confère à cette région un rôle essentiel dans les étapes d'entrée du virus. Nos résultats avec le VIS suggèrent un rôle fonctionnel différent de la boucle V3 chez VIH-1 et VIS.

3/ A étudier l'effet de l'interaction virus-cellule sur l'activation de la voie PKC. Nous avons montré que le virus (ou la gp120) seule est capable d'activer l'isoforme PKC- δ . Nos résultats montrent que l'inhibition de cette PKC- δ par des inhibiteurs chimiques, des oligonucléotides anti-sens ou des dominants négatifs conduit au blocage du cycle viral en interférant avec l'intégrité du cytosquelette d'actine.

Des efforts considérables sont actuellement employés pour le développement de nouveaux agents antiviraux capables de bloquer l'entrée du VIH-1. Le VIH-1 est un lentivirus qui présente un tropisme pour les cellules CD4+. Il infecte préférentiellement les lymphocytes T4, les monocytes et les macrophages (Klatzmann, Champagne et al. 1984). Son enveloppe est constituée d'une glycoprotéine externe, la gp120 et d'une glycoprotéine transmembranaire, la gp41. Dans la particule virale, ces deux glycoprotéines sont structurées sous forme de trimères et interagissent entre elles par des liaisons non covalentes. La gp41 est impliquée dans l'étape de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule cible (Moore 1997).

Des travaux récents ont permis de montrer que l'étape de fusion se déroule selon un processus dynamique. En effet, l'interaction de la gp120 avec le récepteur et le corécepteur conduit à de multiples changements de conformation de la gp41, se traduisant par l'externalisation du domaine de fusion N-terminal qui à son tour, interagit avec la membrane de la cellule cible (Chan and Kim 1998), mais également par l'exposition d'un faisceau de

trimère d'hélice- α constitué par les domaines N36 ou HRI et C34 ou HRII. Toutefois, l'accessibilité de ces domaines reste transitoire puisque leur exposition est immédiatement suivie par leur interaction (HRI-HRII) en un ensemble de six hélices permettant une restructuration de l'ectodomaine de la gp41 en épingle à cheveux, et donc le rapprochement de l'enveloppe du virus et de la membrane de la cellule cible et leur fusion (Chan, Fass et al. 1997; Chan and Kim 1998; Rizzuto, Wyatt et al. 1998; Berger, Murphy et al. 1999). Le blocage de cette étape de fusion conduit à l'inhibition de l'entrée du virus et par conséquent, à l'interruption de sa réplication empêchant ainsi l'infection de la cellule. Cette étape constitue donc une cible importante pour le développement de molécules antirétrovirales.

L'analyse de la structure de la gp41 permet de localiser les différents domaines incluant le domaine de fusion FP, les domaines HRI et HRII ainsi que la séquence du peptide T-20 qui peut être considéré comme un analogue structural du domaine C34. Ce dernier peptide est aussi appelé, enfuvirtide ou Fuzeon®. C'est la première molécule peptidique anti-VIH-1, utilisée actuellement chez les patients en échec thérapeutique (avec la trithérapie). Elle agit en interférant avec l'étape de fusion (Kilby, Hopkins et al. 1998; D'Souza, Cairns et al. 2000).

Les domaines N36 et C34 se structurent en hélice- α . Les études de co-cristallisation du complexe N36/C34 ont montré que ce complexe est formé de 3 hélices de N36 qui forment un trimère parallèle à l'intérieur de la gp41, alors que les hélices formées par les domaines C34 se retrouvent disposées de façon anti-parallèles à l'extérieur et entourent le trimère N36. De plus, ces études ont révélé l'importance de trois résidus hydrophobes (Tryptophane 628 et 631, Isoleucine 635) qui semblent s'insérer dans une cavité profonde du peptide N36 (Chan, Fass et al. 1997; Chan and Kim 1998). D'ailleurs, la mutation de ces résidus s'accompagne par l'abrogation de l'interaction N36/C34 et l'inhibition de l'entrée du virus par fusion dans la cellule cible (Chan, Fass et al. 1997; Tan, Liu et al. 1997; Chan, Chutkowski et al. 1998; Chan and Kim 1998).

En effet, la fusion membranaire est une étape clef du cycle viral du VIH-1. Tout blocage de cette étape conduit à une inhibition de la réplication virale. Actuellement de nombreux travaux sont consacrés au développement de molécules peptidiques analogues des domaines N36 et C34 capables de bloquer l'entrée du virus en interférant avec ce mécanisme de fusion (Joyce, Hurni et al. 2002; Sia, Carr et al. 2002; Louis, Nesheiwat et al. 2003; Sia and Kim 2003). Un premier succès a d'ores et déjà été obtenu avec le peptide T-20. Il s'agit d'un peptide de 36 acides aminés capable d'inhiber, à des concentrations de l'ordre du nM, la réplication virale (Kilby, Hopkins et al. 1998; D'Souza, Cairns et al. 2000), en interférant avec la trimérisation de la gp41 (Melikyan, Markosyan et al. 2000; Gallo, Puri et al. 2001; He,

Vassell et al. 2003). Malgré son efficacité, son utilisation reste toutefois délicate, du fait i) de sa faible demi-vie, et ii) de la quantité élevée (2x90 mg/jour) de peptide devant être administrée par injection sous cutanée afin d'assurer une activité antivirale efficace. Ainsi, ce traitement, bien qu'il soit efficace, reste lourd à supporter par les patients en plus de son coût élevé. Notons aussi que plusieurs travaux récents ont rapporté l'apparition d'isolats viraux résistants à cette molécule (Rimsky, Shugars et al. 1998; Wei, Decker et al. 2002; Menzo, Castagna et al. 2004; Xu, Pozniak et al. 2005; Perez-Alvarez, Carmona et al. 2006). Il est donc nécessaire de poursuivre le développement de nouvelles molécules capables de bloquer le mécanisme de fusion. Parallèlement à la molécule T-20, des travaux essaient de développer d'autres peptides inhibiteurs analogues des domaines N36 et C34. Malheureusement, cette approche est confrontée à plusieurs difficultés dont les principales sont liées à la solubilité des peptides, leur agrégation, leur repliement incorrect et leur courte demi-vie (Joyce, Hurni et al. 2002; Sia, Carr et al. 2002; Louis, Nesheiwat et al. 2003; Sia and Kim 2003). Plusieurs stratégies, incluant l'induction d'une structure en hélice- α (Joyce, Hurni et al. 2002; Sia, Carr et al. 2002; Louis, Nesheiwat et al. 2003; Sia and Kim 2003), l'augmentation de la solubilité par l'addition d'acides aminés chargés dans les positions non essentielles de l'hélice (b), (c), (f), (g) et (h), ou de protéines hybrides (Otaka, Nakamura et al. 2002) sont en cours d'évaluation par différents groupes.

Afin de s'affranchir de ces limitations, notre objectif a consisté à modéliser des peptides analogues des domaines C34 de la gp41 en introduisant des acides aminés de configuration D principalement au niveau des sites clivés en premier par les protéases. L'objectif final étant de développer des inhibiteurs de l'étape d'entrée du VIH-1 ayant une grande demi-vie dans les milieux physiologiques (sérum, liquide céphalo-rachidien et liquide séminal). Pour ce faire, nous avons procédé de la manière suivante en :

- i) Identifiant des sites de clivage les plus sensibles à la dégradation protéolytique des peptides C34.
- ii) Synthétisant de nouveaux analogues modifiés sélectivement, en introduisant des acides aminés de la série D, au niveau du (ou des) site(s) sensible(s) en collaborant avec le laboratoire D'Ernest Giralt, Barcelone.
- iii) Recherchant la présence de structure en hélice α dans les nouveaux analogues peptidiques par dichroïsme circulaire.
- iv) Vérifiant la capacité d'interaction entre les analogues de C34 modifiés et le peptide N36 en suivant la formation de structure en hélice par dichroïsme circulaire et la

formation de faisceaux de six hélices entre les analogues peptidiques de C34 et N36 par SDS-PAGE.

- v) Evaluant l'activité antivirale des analogues peptidiques de C34, d'une part dans des tests d'inhibition de fusion et, d'autre part pour leur capacité à bloquer la réplication de virus de tropisme X4 et R5 *in vitro*.

Les peptides suivants ont été synthétisés:

C34L : (WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL), C34D (assemblé en D aa) : (wmewdreinnytslihslieesqnqqekneqell), C34M2 : (WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEKELL), C34M3 : (WeEWDRKINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEKELL), N36: (SGIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL), T-20: (YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF). Les lettres en minuscules représentent des acides aminés de la série D. Les peptides C34 ou HRII, N36 ou HRI et T-20 ou enfuvirtide correspondent à des séquences de la gp41 de la souche Lai du VIH-1.

Le choix des analogues C34M2 et C34M3 est basé sur les critères suivants :

Le peptide C34M2 : Le glutamate 27 et la lysine 31 ont été remplacés par leurs homologues en configuration D. Le changement de la L-lysine en D-lysine a pour but d'augmenter la résistance au clivage du peptide au niveau de cette lysine par les activités « Trypsin like ». Quant au changement du L-glutamate en D-glutamate, il est justifié par des contraintes structurales. En effet, dans les configurations en D, les chaînes latérales sont orientées à l'opposé de celles en L. Le fait de procéder à ces deux changements sur le glutamate 27 et la lysine 31, a pour but de permettre aux charges, négatives du glutamate et positives de la lysine de se trouver dans un voisinage proche compatible avec la formation d'un pont salin nécessaire à la stabilisation de la structure en hélice du peptide.

Le peptide C34M3 : en plus des deux modifications citées ci dessus, deux autres modifications ont été introduites dans cet analogue du peptide C34L. En position 2, une méthionine a été remplacée par un glutamate de configuration D, et en position 7, un glutamate a été remplacé par une lysine. L'objectif de ces modifications est d'introduire, d'une part, un site de résistance aux dipeptidyl protéases grâce à la présence du D-glutamate en position 2 et d'autre part de permettre à cet acide aminé d'établir un pont salin avec un acide aminé basique ; d'où l'intérêt de l'introduction d'une lysine en position 7 à la place du glutamate. Cependant, il est important d'envisager de resynthétiser ce même analogue mais avec une lysine de configuration D (WeEWDRKINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEKELL) afin de supprimer cette sensibilité aux protéases. Le bénéfice de l'introduction de la L-lysine

en position 7 semble être neutralisé par la plus forte sensibilité du peptide C34M3 à la dégradation par les activités « Trypsin like » (demi-vie de moins de 15 min), d'où l'intérêt de substituer la L-Lysine par la D-lysine.

Il est intéressant de constater que le peptide C34D, se structure aussi en hélice- α mais avec une structure qui correspond à l'image dans un miroir de celle du peptide C34L. Les peptides C34L et C34D possèdent donc une structure en hélice- α lorsqu'ils sont testés dans une solution à 30% de trifluoro-éthanol (TFE). Nous avons ensuite analysé, par dichroïsme circulaire, l'interaction entre les peptides N36 et C34 et les analogues de C34 ainsi que la présence de structures en hélice α . Cette analyse montre la capacité des peptides C34L ainsi que celle du C34M2 et C34M3 à interagir avec le peptide N36 et former une structure en hélice α qui se caractérise par un double minimum à 208-222 nm. Cette formation de l'hélice α a lieu malgré l'introduction des substitutions ponctuelles en aa de la série D dans la séquence. En revanche, cette interaction est complètement abolie avec les analogues rétro et rétro-inverso. En effet, dans l'ensemble de nos travaux, nous avons établi une corrélation entre la capacité des analogues de C34 à interagir avec le peptide N36 et leur activité antivirale. Nous possédons donc, ici, un outil supplémentaire de criblage de peptides actifs pour l'inhibition de l'entrée du virus. Il reste cependant à gérer deux autres facteurs en parallèle : d'une part, développer des peptides avec une très bonne solubilité afin d'envisager leur utilisation chez l'homme par voie orale, et, d'autre part, obtenir des peptides possédant une forte demi-vie afin d'éviter des administrations multiples qui présentent de réelles contraintes pour le patient. L'absence d'activité antivirale, mise en évidence avec l'analogue assemblé totalement en acides aminés de série D, souligne aussi l'importance de la structure pour l'activité antivirale. Cependant, cette approche a été utilisée récemment avec succès en utilisant le système de criblage du « phage display » (Welch, VanDemark et al. 2007). La stratégie des auteurs a consisté à rechercher des peptides analogues de la région HR1I capables d'interagir avec la région HRI préalablement synthétisée avec des acides aminés de série D. Tenant compte de la complémentarité dans l'interaction HRI-HR1I, les peptides actifs de HR1I ont été synthétisés à leur tour avec des acides aminés de série D. L'activité antivirale de ces peptides a été évaluée et l'IC50 mesurée à des valeurs de l'ordre de la centaine de pM.

Pour bien comprendre comment certains virus, suite à des mutations, deviennent résistants à des antiviraux comme le T-20 par exemple, il faudrait prendre en considération le

mécanisme d'action antiviral de ces peptides au niveau dynamique et structural. Comme il a été exposé précédemment, le peptide C34 et, en partie, le T-20, inhibent la réplication virale en interagissant avec le trimère de HRI, empêchant ainsi l'interaction HRI-HRII et par conséquent le rapprochement des membranes virales et cellulaires, nécessaire à la fusion membranaire. Or, dans la structure trimérique de la gp41 les domaines HRI et HRII ne sont pas accessibles et par conséquent ne peuvent interagir entre eux. En revanche, ces domaines deviennent accessibles suite aux réarrangements structuraux induits par l'interaction gp120-CD4-CCR5/CXCR4. De plus, cette accessibilité n'est que transitoire dans un processus dynamique qui conduit ensuite à l'interaction entre les domaines HRI et HRII. Par conséquent, pour être actif, un peptide, tel que le C34, doit être présent à des concentrations suffisantes au voisinage des membranes virale et cellulaire, pendant cette phase transitoire, pour entrer en compétition avec le domaine HRII. De plus, un deuxième handicap pour le peptide inhibiteur soluble est qu'il entre en compétition avec son homologue de l'ectodomaine de la gp41. Dans cette compétition, il paraît clair que les interactions intramoléculaires entre HRI et HRII situées sur le même segment de la gp41 ont plus de chances d'avoir lieu que des interactions intermoléculaires entre le domaine HRI situé sur l'ectodomaine de la gp41 et le HRII porté par le peptide médicament. Cet handicap doit être compensé par la présence de grandes concentrations de peptide libre au voisinage du virus qui entame le processus de fusion. On peut donc résumer cette situation en disant que le peptide inhibiteur doit être présent au bon endroit et au bon moment à des concentrations efficaces. Cette dernière condition est loin d'être satisfaite dans tous les tissus de l'organisme. En effet, les différentes études pharmacocinétiques montrent clairement une diffusion inégale du peptide dans les différents tissus après son administration par injection. Ainsi la faible concentration de peptides, dans certains compartiments, pourrait contribuer au développement de réservoirs latents de virus. Afin d'obtenir une meilleure efficacité, il est impératif de prendre en compte ce facteur, et donc de développer des stratégies de vectorisation qui permettraient de protéger les peptides et de les véhiculer au niveau des membranes des cellules cibles. Une telle approche pourrait être développée de deux manières:

- 1) en complexant les peptides via un groupement NH₂ de lysine à une chaîne lipidique en C18 associé à un linker de polyéthylène glycol. Notons que cette stratégie appliquée au peptide T-20 a permis de développer une molécule, TRI-999, qui inhibe le VIH-1 avec une IC₅₀ 7 fois plus efficace (Davidson, Medinas et al. 2006; Delmedico, Bray et al. 2006). Notons aussi que le même groupe a développé, par modélisation, une nouvelle molécule analogue de T-20, nommée TRI-1144 qui se caractérise par une activité antivirale

qui reste efficace sur les isolats résistants au T-20 (Davidson, Medinas et al. 2006; Delmedico, Bray et al. 2006). Ces résultats récents sont en accord avec la faisabilité pour le C34 et ses analogues.

2) en encapsulant les peptides dans des nanoparticules de différentes natures (glycolipidique, lipidique...) afin de développer des formulations capables de protéger les peptides sous leur forme active et d'assurer leur délivrance durant plusieurs jours. Un tel résultat présenterait une avancée considérable dans l'amélioration du traitement des patients infectés par le VIH-1.

Les peptides T-20, C34 et ses analogues présentent également des propriétés intéressantes pour la conception de microbicides. Des essais encourageants ont été réalisés dans le modèle macaque. Par exemple, des essais récents ont été réalisés en utilisant la molécule tenofovir, un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (Fung, Stone et al. 2002). Cet inhibiteur a été administré par voie rectale dans un gel 2 heures avant le challenge par voie rectale avec l'équivalent de 20 MID50 (Monkey Infection dose 50%) de virus SIVmac. Les résultats obtenus montrent que 8 macaques sur 9 ont été protégés dans ces conditions ; en revanche, si le microbicide est administré 2 heures après le challenge, aucune protection n'est observée (Plos Medecine 2008, 5, 157). D'autres travaux réalisés avec le peptide C52L, un analogue du peptide T-20 ou le BMS378806, un inhibiteur de l'interaction gp120-CD4, ont montré que l'administration de ces inhibiteurs dans un gel d'hydroxyméthyle cellulose permet de conférer une protection partielle contre le virus SHIV administré par voie vaginale. En revanche, l'association des deux inhibiteurs permet de conférer une protection totale des macaques (6 sur 6 protégés) (Veazey, Klasse et al. 2005).

On peut également envisager une approche par thérapie génique. Cette approche présente un réel intérêt et peut être préalablement validée dans le modèle SIV/macaque avant d'envisager une application chez l'homme. Cette technique pourrait permettre de modifier les bactéries qui colonisent les muqueuses vaginales de telle sorte qu'elles produisent des peptides analogues de T-20 et C34. Cette stratégie pourrait se faire à l'image de ce qui se fait en chimie combinatoire. Ainsi les peptides produits pourraient couvrir un large spectre de séquences et de structures et par conséquent d'activité antivirales.

Le dernier point qui mérite d'être discuté concerne la compréhension de la méthodologie à développer permettant d'obtenir des peptides à activité antivirale de large spectre.

Le traitement avec les différents antiviraux conduit inévitablement à la sélection d'isolats viraux de résistance. Leur émergence est liée à la grande variabilité du virus VIH. Lorsque cette variabilité touche des acides aminés essentiels dans les domaines HRI ou HRII ou bien les domaines importants dans l'interaction virus-cellule, elle conduit à des modifications de structure au niveau de l'interaction HRI-HRII. Comme conséquence, les structures initiales des peptides T-20 ou C34, ne permettent plus d'assurer l'interaction avec le domaine HRI viral à cause des contraintes structurales induites par les mutations portées par les variants viraux de résistance. L'une des stratégies pour contourner cette limitation serait de modéliser des peptides analogues de T-20 ou C34 mais qui se caractérisent par une forte flexibilité permettant de compenser les modifications structurales induites par les mutations au niveau du site de fixation de HRI.

Le développement de tels inhibiteurs nécessite une bonne connaissance de la structure tridimensionnelle des complexes gp120-CD4, gp120CD4-CCR5/CXCR4 et de la structure de la gp41 trimérique.

De nombreux travaux restent à réaliser pour optimiser l'utilisation des molécules antivirales actuellement en cours de développement. Le fait que des molécules comme le BMS-488043 (Ho, Fan et al. 2006), qui a une petite taille compatible avec une administration orale, et la protéine de fusion CD4-Ig Pro542, présentent une activité antivirale efficace chez les patients infectés est très encourageant (Jacobson, Israel et al. 2004). De plus, cela confirme l'importance de la glycoprotéine d'enveloppe comme cible pour le développement d'antirétroviraux. Cependant, cette activité antivirale est observée uniquement durant une période relativement courte. En effet, la grande variabilité de la gp120 réduit le spectre antiviral de ces molécules et augmente les probabilités d'apparition d'isolats viraux résistants. Par conséquent, il est nécessaire de mettre en œuvre de nombreux essais cliniques dans le but de comprendre le mécanisme d'émergence d'isolats résistants chez les patients soumis aux différents traitements antiviraux.

L'objectif consiste à associer des molécules possédant des modes d'action et des cibles différentes afin d'atténuer, voire annuler, les mécanismes de développement des résistances. Il est également important de rester vigilant quant à l'utilisation d'inhibiteurs ciblant des molécules telles que le CD4. En effet, le blocage de ce type de récepteur indispensable pour la réponse immunitaire et dans la transduction des signaux d'activation cellulaire, peut entraîner l'apparition d'effets secondaires très graves pour le patient. Cependant, des résultats encourageants obtenus avec le TNX-355 suggèrent que l'inhibition du récepteur CD4 ne

semble pas délétère pour les patients (Kuritzkes, Jacobson et al. 2004). Le blocage du CD4 reste, pour l'instant, une cible intéressante à ne pas exclure pour le développement d'antirétroviraux contre le VIH-1.

REFERENCES

- Aharinejad, S., M. Sioud, et al. (2007). "Target validation using RNA interference in solid tumors." *Methods Mol Biol* **361**: 227-38.
- Alcami, J., T. Lain de Lera, et al. (1995). "Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes." *Embo J* **14**(7): 1552-60.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, et al. (1996). "CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." *Science* **272**(5270): 1955-8.
- Allaway, G. P., K. L. Davis-Bruno, et al. (1995). "Expression and characterization of CD4-IgG2, a novel heterotetramer that neutralizes primary HIV type 1 isolates." *AIDS Res Hum Retroviruses* **11**(5): 533-9.
- Alvarez Losada, S., C. Canto-Nogues, et al. (2002). "A new possible mechanism of human immunodeficiency virus type 1 infection of neural cells." *Neurobiol Dis* **11**(3): 469-78.
- Amara, A., S. L. Gall, et al. (1997). "HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication." *J Exp Med* **186**(1): 139-46.
- Amara, R. R., F. Villinger, et al. (2001). "Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine." *Science* **292**(5514): 69-74.
- Ansari-Lari, M. A., X. M. Liu, et al. (1997). "The extent of genetic variation in the CCR5 gene." *Nat Genet* **16**(3): 221-2.
- Ao, Z., X. Yao, et al. (2004). "Assessment of the role of the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 replication by using a single-cycle replication system." *J Virol* **78**(6): 3170-7.
- Arhel, N. J., S. Souquere-Besse, et al. (2007). "HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore." *Embo J* **26**(12): 3025-37.
- Arien, K. K., A. Abraha, et al. (2005). "The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates." *J Virol* **79**(14): 8979-90.
- Armand-Ugon, M., I. Clotet-Codina, et al. (2005). "The anti-HIV activity of ADS-J1 targets the HIV-1 gp120." *Virology* **343**(1): 141-9.
- Armand-Ugon, M., A. Gutierrez, et al. (2003). "HIV-1 resistance to the gp41-dependent fusion inhibitor C-34." *Antiviral Res* **59**(2): 137-42.
- Ayouba, A., P. Mauclore, et al. (2001). "HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998." *Emerg Infect Dis* **7**(3): 466-7.
- Baba, M., K. Takashima, et al. (2005). "TAK-652 inhibits CCR5-mediated human immunodeficiency virus type 1 infection in vitro and has favorable pharmacokinetics in humans." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(11): 4584-91.
- Babcock, G. J., M. Farzan, et al. (2003). "Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor." *J Biol Chem* **278**(5): 3378-85.
- Badou, A., Y. Bennasser, et al. (2000). "Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway." *J Virol* **74**(22): 10551-62.

- Ball, R. A. and T. Kinchelow (2003). "Injection site reactions with the HIV-1 fusion inhibitor enfuvirtide." J Am Acad Dermatol **49**(5): 826-31.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-71.
- Bartz, S. R. and M. Emerman (1999). "Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/caspase-8." J Virol **73**(3): 1956-63.
- Bendjennat, M., B. Bahbouhi, et al. (2001). "Purification and characterization of a Ca²⁺-independent endoprotease activity from peripheral blood lymphocytes: involvement in HIV-1 gp160 maturation." Biochemistry **40**(15): 4800-10.
- Benjouad, A., T. Babas, et al. (1993). "N-linked oligosaccharides of simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins are dispensable for the interaction with the CD4 receptor." Biochem Biophys Res Commun **190**(2): 311-9.
- Benjouad, A., J. C. Gluckman, et al. (1992). "Influence of carbohydrate moieties on the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 recombinant gp160." J Virol **66**(4): 2473-83.
- Bennasser, Y. and E. Bahraoui (2002). "HIV-1 Tat protein induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: involvement of protein kinase C-betaII and -delta." Faseb J **16**(6): 546-54.
- Bennasser, Y., X. Contreras, et al. (2001). "[HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by human monocytes: implications of the PKC and calcium pathway]." J Soc Biol **195**(3): 319-26.
- Bennasser, Y., S. Y. Le, et al. (2005). "Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing." Immunity **22**(5): 607-19.
- Bennasser, Y., M. L. Yeung, et al. (2006). "HIV-1 TAR RNA subverts RNA interference in transfected cells through sequestration of TAR RNA-binding protein, TRBP." J Biol Chem **281**(38): 27674-8.
- Berger, D. S. (2008). "Comparing two integrase inhibitors. The first head-to-head study comparing raltegravir and elvitegravir." Posit Aware **19**(5): 49-51.
- Berger, E. A., P. M. Murphy, et al. (1999). "Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease." Annu Rev Immunol **17**: 657-700.
- Blanpain, C., F. Libert, et al. (2002). "CCR5 and HIV infection." Receptors Channels **8**(1): 19-31.
- Blanpain, C., V. Wittamer, et al. (2001). "Palmitoylation of CCR5 is critical for receptor trafficking and efficient activation of intracellular signaling pathways." J Biol Chem **276**(26): 23795-804.
- Bonyhadi, M. L., L. Rabin, et al. (1993). "HIV induces thymus depletion in vivo." Nature **363**(6431): 728-32.
- Bosch, V. and M. Pawlita (1990). "Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 env gene product proteolytic cleavage site." J Virol **64**(5): 2337-44.
- Botarelli, P., B. A. Houlden, et al. (1991). "N-glycosylation of HIV-gp120 may constrain recognition by T lymphocytes." J Immunol **147**(9): 3128-32.
- Bour, S., R. Geleziunas, et al. (1995). "The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection." Microbiol Rev **59**(1): 63-93.
- Bour, S., U. Schubert, et al. (1996). "The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor?" J Virol **70**(2): 820-9.

- Brenner, S. and H. L. Malech (2003). "Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy." Biochim Biophys Acta **1640**(1): 1-24.
- Bukrinsky, M. (2004). "A hard way to the nucleus." Mol Med **10**(1-6): 1-5.
- Campochiaro, P. A. (2006). "Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders." Gene Ther **13**(6): 559-62.
- Capodici, J., K. Kariko, et al. (2002). "Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference." J Immunol **169**(9): 5196-201.
- Carrington, M., T. Kissner, et al. (1997). "Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5." Am J Hum Genet **61**(6): 1261-7.
- Cartier, C., P. Sivard, et al. (1999). "Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection." J Biol Chem **274**(27): 19434-40.
- Caruz, A., M. Samsom, et al. (1998). "Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene." FEBS Lett **426**(2): 271-8.
- Cavrois, M., J. Neidleman, et al. (2006). "Human immunodeficiency virus fusion to dendritic cells declines as cells mature." J Virol **80**(4): 1992-9.
- Cazeaux, N., Y. Bennasser, et al. (2002). "Comparative study of immune responses induced after immunization with plasmids encoding the HIV-1 Nef protein under the control of the CMV-IE or the muscle-specific desmin promoter." Vaccine **20**(27-28): 3322-31.
- Chan, D. C., C. T. Chutkowski, et al. (1998). "Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15613-7.
- Chan, D. C., D. Fass, et al. (1997). "Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein." Cell **89**(2): 263-73.
- Chan, D. C. and P. S. Kim (1998). "HIV entry and its inhibition." Cell **93**(5): 681-4.
- Chen, B., E. M. Vogan, et al. (2005). "Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core." Nature **433**(7028): 834-41.
- Choe, H., M. Farzan, et al. (1998). "The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1." J Virol **72**(7): 6113-8.
- Cilliers, T., J. Nhlapo, et al. (2003). "The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C." J Virol **77**(7): 4449-56.
- Clavel, F., D. Guetard, et al. (1986). "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS." Science **233**(4761): 343-6.
- Clavel, F., K. Mansinho, et al. (1987). "Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa." N Engl J Med **316**(19): 1180-5.
- Cocchi, F., A. L. DeVico, et al. (1995). "Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells." Science **270**(5243): 1811-5.
- Coffin, J. M., S. H. Hughes, et al. (1997). Retroviruses. Plainview, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Combadiere, C., S. K. Ahuja, et al. (1995). "Cloning and functional expression of a human eosinophil CC chemokine receptor." J Biol Chem **270**(28): 16491-4.
- Combadiere, C., S. K. Ahuja, et al. (1996). "Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES." J Leukoc Biol **60**(1): 147-52.
- Cron, R. Q., S. R. Bartz, et al. (2000). "NFAT1 enhances HIV-1 gene expression in primary human CD4 T cells." Clin Immunol **94**(3): 179-91.

- Cui, J., P. K. Tungaturthi, et al. (2006). "The role of Vpr in the regulation of HIV-1 gene expression." Cell Cycle **5**(22): 2626-38.
- Curtis, B. M., S. Scharnowske, et al. (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): 8356-60.
- D'Souza, M. P., J. S. Cairns, et al. (2000). "Current evidence and future directions for targeting HIV entry: therapeutic and prophylactic strategies." Jama **284**(2): 215-22.
- Daecke, J., O. T. Fackler, et al. (2005). "Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry." J Virol **79**(3): 1581-94.
- Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." Nature **312**(5996): 763-7.
- Daniel, M. D., F. Kirchhoff, et al. (1992). "Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene." Science **258**(5090): 1938-41.
- Darby, S. C., D. W. Ewart, et al. (1996). "Importance of age at infection with HIV-1 for survival and development of AIDS in UK haemophilia population. UK Haemophilia Centre Directors' Organisation." Lancet **347**(9015): 1573-9.
- Dave, R. S. and R. J. Pomerantz (2004). "Antiviral effects of human immunodeficiency virus type 1-specific small interfering RNAs against targets conserved in select neurotropic viral strains." J Virol **78**(24): 13687-96.
- Davidson, D., R. Medinas, et al. (2006). "Toronto, Canada. New fusion inhibitor peptides, TRI-99 AND TRI-1144, are potent inhibitors of Enfuvirtide and T-1249 resistant isolates." 16th International AIDS Conference(Abstract ThPE0021).
- De Corte, B. L. (2005). "From 4,5,6,7-tetrahydro-5-methylimidazo[4,5,1-jk](1,4)benzodiazepin-2(1H)-one (TIBO) to etravirine (TMC125): fifteen years of research on non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase." J Med Chem **48**(6): 1689-96.
- Deen, K. C., J. S. McDougal, et al. (1988). "A soluble form of CD4 (T4) protein inhibits AIDS virus infection." Nature **331**(6151): 82-4.
- DeHart, J. L., E. S. Zimmerman, et al. (2007). "HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system." Virol J **4**: 57.
- Delenda, C. (2004). "Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression." J Gene Med **6 Suppl 1**: S125-38.
- Delmedico, K., B. Bray, et al. (2006). "Denver, CO, USA. Next generation HIV peptide fusion inhibitor candidate achieve potent, durable suppression of virus replication in vitro and improved pharmacokinetic properties." 13th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections(Abstract 48).
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**(6584): 661-6.
- Deng, H. K., D. Unutmaz, et al. (1997). "Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses." Nature **388**(6639): 296-300.
- Derdeyn, C. A., J. M. Decker, et al. (2001). "Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to fusion inhibitors targeted to the gp41 first heptad repeat involves distinct regions of gp41 and is consistently modulated by gp120 interactions with the coreceptor." J Virol **75**(18): 8605-14.
- Dey, B., C. S. Del Castillo, et al. (2003). "Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by sCD4-17b, a single-chain chimeric protein, based on sequential interaction of gp120 with CD4 and coreceptor." J Virol **77**(5): 2859-65.

- Dimitrov, A. S., S. S. Rawat, et al. (2003). "Role of the fusion peptide and membrane-proximal domain in HIV-1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion." Biochemistry **42**(48): 14150-8.
- Doranz, B. J., L. G. Fillion, et al. (2001). "Safe use of the CXCR4 inhibitor ALX40-4C in humans." AIDS Res Hum Retroviruses **17**(6): 475-86.
- Endres, M. J., P. R. Clapham, et al. (1996). "CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4." Cell **87**(4): 745-56.
- Ewart, G. D., T. Sutherland, et al. (1996). "The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels." J Virol **70**(10): 7108-15.
- Fackler, O. T. and B. M. Peterlin (2000). "Endocytic entry of HIV-1." Curr Biol **10**(16): 1005-8.
- Federau, T., U. Schubert, et al. (1996). "Solution structure of the cytoplasmic domain of the human immunodeficiency virus type 1 encoded virus protein U (Vpu)." Int J Pept Protein Res **47**(4): 297-310.
- Feng, Y., C. C. Broder, et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-7.
- Fenouillet, E., B. Clerget-Raslain, et al. (1989). "Role of N-linked glycans in the interaction between the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus and its CD4 cellular receptor. Structural enzymatic analysis." J Exp Med **169**(3): 807-22.
- Fields, B. N., D. M. Knipe, et al. (2007). Fields' virology. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Firley, D., B. Courcot, et al. (2006). "Experimental/theoretical electrostatic properties of a styrylquinoline-type HIV-1 integrase inhibitor and its progenitors." J Phys Chem B **110**(1): 537-47.
- Fortin, J. F., R. Cantin, et al. (1997). "Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity." J Virol **71**(5): 3588-96.
- Fragoso, R., D. Ren, et al. (2003). "Lipid raft distribution of CD4 depends on its palmitoylation and association with Lck, and evidence for CD4-induced lipid raft aggregation as an additional mechanism to enhance CD3 signaling." J Immunol **170**(2): 913-21.
- Franke, E. K. and J. Luban (1995). "Cyclophilin and gag in HIV-1 replication and pathogenesis." Adv Exp Med Biol **374**: 217-28.
- Fung, H. B., E. A. Stone, et al. (2002). "Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection." Clin Ther **24**(10): 1515-48.
- Gaertner, H., O. Lebeau, et al. (2008). "Highly potent HIV inhibition: engineering a key anti-HIV structure from PSC-RANTES into MIP-1 beta/CCL4." Protein Eng Des Sel **21**(2): 65-72.
- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, et al. (1984). "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS." Science **224**(4648): 500-3.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, et al. (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 865-7.
- Gallo, R. C. and F. Wong-Staal (1985). "A human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-III) as the cause of the acquired immunodeficiency syndrome." Ann Intern Med **103**(5): 679-89.
- Gallo, S. A., A. Puri, et al. (2001). "HIV-1 gp41 six-helix bundle formation occurs rapidly after the engagement of gp120 by CXCR4 in the HIV-1 Env-mediated fusion process." Biochemistry **40**(41): 12231-6.

- Gartel, A. L. and E. S. Kandel (2006). "RNA interference in cancer." *Biomol Eng* **23**(1): 17-34.
- Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, et al. (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." *Cell* **100**(5): 587-97.
- Geijtenbeek, T. B. and Y. van Kooyk (2003). "DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission." *Curr Top Microbiol Immunol* **276**: 31-54.
- Geijtenbeek, T. B., S. J. van Vliet, et al. (2001). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1 receptor present in placenta that infects T cells in trans-a review." *Placenta* **22 Suppl A**: S19-23.
- Gelmann, E. P., M. Popovic, et al. (1983). "Proviral DNA of a retrovirus, human T-cell leukemia virus, in two patients with AIDS." *Science* **220**(4599): 862-5.
- Gilbert, P. B., I. W. McKeague, et al. (2003). "Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal." *Stat Med* **22**(4): 573-93.
- Goldsmith, M. A., M. T. Warmerdam, et al. (1995). "Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef." *J Virol* **69**(7): 4112-21.
- Gomez-Mouton, C., R. A. Lacalle, et al. (2004). "Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis." *J Cell Biol* **164**(5): 759-68.
- Goncalves, J., Y. Korin, et al. (1996). "Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription." *J Virol* **70**(12): 8701-9.
- Gong, J. H., M. Ugucioni, et al. (1996). "RANTES and MCP-3 antagonists bind multiple chemokine receptors." *J Biol Chem* **271**(18): 10521-7.
- Goudsmit, J., C. Debouck, et al. (1988). "Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(12): 4478-82.
- Gray, E. S., P. L. Moore, et al. (2007). "N-linked glycan modifications in gp120 of human immunodeficiency virus type 1 subtype C render partial sensitivity to 2G12 antibody neutralization." *J Virol* **81**(19): 10769-76.
- Grinsztejn, B., B. Y. Nguyen, et al. (2007). "Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial." *Lancet* **369**(9569): 1261-9.
- Groopman, J. E., F. W. Chen, et al. (1986). "Serological characterization of HTLV-III infection in AIDS and related disorders." *J Infect Dis* **153**(4): 736-42.
- Hadj-Slimane, R., Y. Lepelletier, et al. (2007). "Short interfering RNA (siRNA), a novel therapeutic tool acting on angiogenesis." *Biochimie* **89**(10): 1234-44.
- Halary, F., A. Amara, et al. (2002). "Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection." *Immunity* **17**(5): 653-64.
- Hameau, L., J. Jeusset, et al. (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 central DNA flap: dynamic terminal product of plus-strand displacement dna synthesis catalyzed by reverse transcriptase assisted by nucleocapsid protein." *J Virol* **75**(7): 3301-13.
- Han, W., M. Wind-Rotolo, et al. (2004). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by siRNA targeted to the highly conserved primer binding site." *Virology* **330**(1): 221-32.
- Hazuda, D. J., P. Felock, et al. (2000). "Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells." *Science* **287**(5453): 646-50.
- He, Y., R. Vassell, et al. (2003). "Peptides trap the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein fusion intermediate at two sites." *J Virol* **77**(3): 1666-71.

- Hemming, A., A. Bolmstedt, et al. (1994). "Identification of three N-linked glycans in the V4-V5 region of HIV-1 gp 120, dispensable for CD4-binding and fusion activity of gp 120." Arch Virol **134**(3-4): 335-44.
- Hendrix, C. W., A. C. Collier, et al. (2004). "Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection." J Acquir Immune Defic Syndr **37**(2): 1253-62.
- Hernanz-Falcon, P., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (2004). "Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization." Nat Immunol **5**(2): 216-23.
- Herrmann, C. H. and A. P. Rice (1995). "Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor." J Virol **69**(3): 1612-20.
- Hill, C. M., H. Deng, et al. (1997). "Envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus can use human CCR5 as a coreceptor for viral entry and make direct CD4-dependent interactions with this chemokine receptor." J Virol **71**(9): 6296-304.
- Ho, H. T., L. Fan, et al. (2006). "Envelope conformational changes induced by human immunodeficiency virus type 1 attachment inhibitors prevent CD4 binding and downstream entry events." J Virol **80**(8): 4017-25.
- Hostetler, K. Y., D. D. Richman, et al. (1994). "Phospholipid prodrug inhibitors of the HIV protease. Antiviral activity and pharmacokinetics in rats." Biochem Pharmacol **48**(7): 1399-404.
- Hsu, K., J. Seharaseyon, et al. (2004). "Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host TASK-1 channel." Mol Cell **14**(2): 259-67.
http://www.merck.com/newsroom/press_releases/research_and_development/2007_0921.html (2007).
- Hu, Q., I. Frank, et al. (2004). "Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue." J Exp Med **199**(8): 1065-75.
- Huang, C., M. Li, et al. (2008). "Small interfering RNA therapy in cancer: mechanism, potential targets, and clinical applications." Expert Opin Ther Targets **12**(5): 637-45.
- Huang, L., I. Bosch, et al. (1998). "Tat protein induces human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) coreceptors and promotes infection with both macrophage-tropic and T-lymphotropic HIV-1 strains." J Virol **72**(11): 8952-60.
- Humeau, L. M., G. K. Binder, et al. (2004). "Efficient lentiviral vector-mediated control of HIV-1 replication in CD4 lymphocytes from diverse HIV+ infected patients grouped according to CD4 count and viral load." Mol Ther **9**(6): 902-13.
- Izquierdo, M. (2005). "Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy." Cancer Gene Ther **12**(3): 217-27.
- Jacobs, A., H. Garg, et al. (2008). "HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion and pathogenesis: Implications for therapy and vaccine development." Vaccine.
- Jacobson, J. M., R. J. Israel, et al. (2004). "Treatment of advanced human immunodeficiency virus type 1 disease with the viral entry inhibitor PRO 542." Antimicrob Agents Chemother **48**(2): 423-9.
- Jacque, J. M., K. Triques, et al. (2002). "Modulation of HIV-1 replication by RNA interference." Nature **418**(6896): 435-8.
- Jansson, M., M. Popovic, et al. (1996). "Sensitivity to inhibition by beta-chemokines correlates with biological phenotypes of primary HIV-1 isolates." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15382-7.

- Javaherian, K., A. J. Langlois, et al. (1989). "Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(17): 6768-72.
- Ji, X., H. Gewurz, et al. (2005). "Mannose binding lectin (MBL) and HIV." Mol Immunol **42**(2): 145-52.
- Jiang, S., K. Lin, et al. (1993). "HIV-1 inhibition by a peptide." Nature **365**(6442): 113.
- Jiang, S., K. Lin, et al. (1993). "Inhibition of HIV-1 infection by a fusion domain binding peptide from the HIV-1 envelope glycoprotein GP41." Biochem Biophys Res Commun **195**(2): 533-8.
- Jiang, S., K. Lin, et al. (1999). "A screening assay for antiviral compounds targeted to the HIV-1 gp41 core structure using a conformation-specific monoclonal antibody." J Virol Methods **80**(1): 85-96.
- Joyce, J. G., W. M. Hurni, et al. (2002). "Enhancement of alpha -helicity in the HIV-1 inhibitory peptide DP178 leads to an increased affinity for human monoclonal antibody 2F5 but does not elicit neutralizing responses in vitro. Implications for vaccine design." J Biol Chem **277**(48): 45811-20.
- Kanki, P. J., K. U. Travers, et al. (1994). "Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1." Lancet **343**(8903): 943-6.
- Kestler, H. W., 3rd, D. J. Ringler, et al. (1991). "Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS." Cell **65**(4): 651-62.
- Kido, H., K. Kamoshita, et al. (1993). "Processing protease for gp160 human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein precursor in human T4+ lymphocytes. Purification and characterization." J Biol Chem **268**(18): 13406-13.
- Kilby, J. M., S. Hopkins, et al. (1998). "Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry." Nat Med **4**(11): 1302-7.
- Kishi, M., Y. Nishino, et al. (1992). "Cells surviving infection by human immunodeficiency virus type 1: vif or vpu mutants produce non-infectious or markedly less cytopathic viruses." J Gen Virol **73** (Pt 1): 77-87.
- Klatzmann, D., E. Champagne, et al. (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV." Nature **312**(5996): 767-8.
- Klatzmann, D. R., J. S. McDougal, et al. (1990). "The CD4 molecule and HIV infection." Immunodefic Rev **2**(1): 43-66.
- Kliger, Y., S. A. Gallo, et al. (2001). "Mode of action of an antiviral peptide from HIV-1. Inhibition at a post-lipid mixing stage." J Biol Chem **276**(2): 1391-7.
- Koutsilier, E., A. Rethwilm, et al. (2007). "The therapeutic potential of siRNA in gene therapy of neurodegenerative disorders." J Neural Transm Suppl(72): 43-9.
- Kuhmann, S. E., E. J. Platt, et al. (2000). "Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1." J Virol **74**(15): 7005-15.
- Kuritzkes, D. R., J. Jacobson, et al. (2004). "Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1." J Infect Dis **189**(2): 286-91.
- Kwong, P. D., R. Wyatt, et al. (1998). "Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody." Nature **393**(6686): 648-59.
- Lalezari, J. P., N. C. Bellos, et al. (2005). "T-1249 retains potent antiretroviral activity in patients who had experienced virological failure while on an enfuvirtide-containing treatment regimen." J Infect Dis **191**(7): 1155-63.
- Land, A. and I. Braakman (2001). "Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum." Biochimie **83**(8): 783-90.

- Larder, B. A., G. Darby, et al. (1989). "HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy." *Science* **243**(4899): 1731-4.
- Lasky, L. A., G. Nakamura, et al. (1987). "Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor." *Cell* **50**(6): 975-85.
- Le Gall, S., F. Buseyne, et al. (2000). "Distinct trafficking pathways mediate Nef-induced and clathrin-dependent major histocompatibility complex class I down-regulation." *J Virol* **74**(19): 9256-66.
- Lee, M. T., G. A. Coburn, et al. (2003). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector." *J Virol* **77**(22): 11964-72.
- Lee, N. S. and J. J. Rossi (2004). "Control of HIV-1 replication by RNA interference." *Virus Res* **102**(1): 53-8.
- Lee, S. K., D. M. Dykxhoorn, et al. (2005). "Lentiviral delivery of short hairpin RNAs protects CD4 T cells from multiple clades and primary isolates of HIV." *Blood* **106**(3): 818-26.
- Lemay, J., S. Marullo, et al. (2005). "On the dimerization of CCR5." *Nat Immunol* **6**(6): 535; author reply 535-6.
- Lenz, C., A. Scheid, et al. (1997). "Exon 1 leader sequences downstream of U5 are important for efficient human immunodeficiency virus type 1 gene expression." *J Virol* **71**(4): 2757-64.
- Li, H., H. Song, et al. (2004). "Synthetic bivalent CD4-mimetic miniproteins show enhanced anti-HIV activity over the monovalent miniprotein." *Bioconjug Chem* **15**(4): 783-9.
- Li, J. T., M. Halloran, et al. (1995). "Persistent infection of macaques with simian-human immunodeficiency viruses." *J Virol* **69**(11): 7061-7.
- Liao, F., G. Alkhatib, et al. (1997). "STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1." *J Exp Med* **185**(11): 2015-23.
- Liao, Z., L. M. Cimasky, et al. (2001). "Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1." *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**(11): 1009-19.
- Liu, R., W. A. Paxton, et al. (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." *Cell* **86**(3): 367-77.
- Louis, J. M., I. Nesheiwat, et al. (2003). "Covalent trimers of the internal N-terminal trimeric coiled-coil of gp41 and antibodies directed against them are potent inhibitors of HIV envelope-mediated cell fusion." *J Biol Chem* **278**(22): 20278-85.
- Mack, M., B. Luckow, et al. (1998). "Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity." *J Exp Med* **187**(8): 1215-24.
- Mackay, G. A., Y. Niu, et al. (2002). "Presence of Intact vpu and nef genes in nonpathogenic SHIV is essential for acquisition of pathogenicity of this virus by serial passage in macaques." *Virology* **295**(1): 133-46.
- Madani, N., A. L. Perdigoto, et al. (2004). "Localized changes in the gp120 envelope glycoprotein confer resistance to human immunodeficiency virus entry inhibitors BMS-806 and #155." *J Virol* **78**(7): 3742-52.
- Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, et al. (1986). "The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain." *Cell* **47**(3): 333-48.
- Maddon, P. J., J. S. McDougal, et al. (1988). "HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4." *Cell* **54**(6): 865-74.

- Mahalingam, B., J. M. Louis, et al. (1999). "Structural and kinetic analysis of drug resistant mutants of HIV-1 protease." *Eur J Biochem* **263**(1): 238-45.
- Malim, M. H., J. Hauber, et al. (1989). "The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA." *Nature* **338**(6212): 254-7.
- Manes, S., E. Mira, et al. (1999). "Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells." *Embo J* **18**(22): 6211-20.
- Manetti, F., C. Tintori, et al. (2006). "A combination of molecular dynamics and docking calculations to explore the binding mode of ADS-J1, a polyanionic compound endowed with anti-HIV-1 activity." *J Chem Inf Model* **46**(3): 1344-51.
- Manley, K., A. O'Hara B, et al. (2006). "NFAT4 is required for JC virus infection of glial cells." *J Virol* **80**(24): 12079-85.
- Manley, K., B. A. O'Hara, et al. (2008). "Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) plays a role in SV40 infection." *Virology* **372**(1): 48-55.
- 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): 5087-94.
- Marechal, V., M. C. Prevost, et al. (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis." *J Virol* **75**(22): 11166-77.
- Margottin, F., S. P. Bour, et al. (1998). "A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif." *Mol Cell* **1**(4): 565-74.
- Mariani, R., D. Chen, et al. (2003). "Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif." *Cell* **114**(1): 21-31.
- Marozsan, A. J., S. E. Kuhmann, et al. (2005). "Generation and properties of a human immunodeficiency virus type 1 isolate resistant to the small molecule CCR5 inhibitor, SCH-417690 (SCH-D)." *Virology* **338**(1): 182-99.
- Martin, L., F. Stricher, et al. (2003). "Rational design of a CD4 mimic that inhibits HIV-1 entry and exposes cryptic neutralization epitopes." *Nat Biotechnol* **21**(1): 71-6.
- Mascola, J. R., G. Stiegler, et al. (2000). "Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies." *Nat Med* **6**(2): 207-10.
- Matthews, T., M. Salgo, et al. (2004). "Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes." *Nat Rev Drug Discov* **3**(3): 215-25.
- McCune, J. M., L. B. Rabin, et al. (1988). "Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus." *Cell* **53**(1): 55-67.
- McManus, M. T. and P. A. Sharp (2002). "Gene silencing in mammals by small interfering RNAs." *Nat Rev Genet* **3**(10): 737-47.
- Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, et al. (2000). "Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion." *J Cell Biol* **151**(2): 413-23.
- Menzo, S., A. Castagna, et al. (2004). "Resistance and replicative capacity of HIV-1 strains selected in vivo by long-term enfuvirtide treatment." *New Microbiol* **27**(2 Suppl 1): 51-61.
- Mi, M. Y., J. Zhang, et al. (2005). "Inhibition of HIV derived lentiviral production by TAR RNA binding domain of TAT protein." *Retrovirology* **2**: 71.
- Moore, J. P. (1997). "Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy." *Science* **276**(5309): 51-2.
- Moore, J. P. and J. Binley (1998). "HIV. Envelope's letters boxed into shape." *Nature* **393**(6686): 630-1.

- Moore, J. P., J. A. McKeating, et al. (1990). "Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4." *Science* **250**(4984): 1139-42.
- Moore, J. P. and P. L. Nara (1991). "The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection." *Aids* **5 Suppl 2**: S21-33.
- Moulard, M. and E. Decroly (2000). "Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases." *Biochim Biophys Acta* **1469**(3): 121-32.
- Moynier, M., V. Kavsan, et al. (1998). "Characterization of humoral immune responses induced by immunization with plasmid DNA expressing HIV-1 Nef accessory protein." *Vaccine* **16**(16): 1523-30.
- Myers, S. A., A. A. Selim, et al. (2006). "A prospective clinical and pathological examination of injection site reactions with the HIV-1 fusion inhibitor enfuvirtide." *Antivir Ther* **11**(7): 935-9.
- Nabel, G. J. (2005). "Immunology. Close to the edge: neutralizing the HIV-1 envelope." *Science* **308**(5730): 1878-9.
- Nguyen, D. H., B. Giri, et al. (2005). "Dynamic reorganization of chemokine receptors, cholesterol, lipid rafts, and adhesion molecules to sites of CD4 engagement." *Exp Cell Res* **304**(2): 559-69.
- Nguyen, D. H. and D. Taub (2002). "Cholesterol is essential for macrophage inflammatory protein 1 beta binding and conformational integrity of CC chemokine receptor 5." *Blood* **99**(12): 4298-306.
- Nichols, W. G., H. M. Steel, et al. (2008). "Hepatotoxicity observed in clinical trials of apilaviric (GW873140)." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(3): 858-65.
- Nishitsuji, H., T. Ikeda, et al. (2004). "Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells." *Microbes Infect* **6**(1): 76-85.
- Nishiyama, Y., T. Murakami, et al. (2002). "Anti-HIV-1 peptides derived from partial amino acid sequences of CC-chemokine RANTES. Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted." *Bioorg Med Chem* **10**(12): 4113-7.
- Nitahara-Kasahara, Y., M. Kamata, et al. (2007). "Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages." *J Virol* **81**(10): 5284-93.
- Novina, C. D., M. F. Murray, et al. (2002). "siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection." *Nat Med* **8**(7): 681-6.
- Oberlin, E., A. Amara, et al. (1996). "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." *Nature* **382**(6594): 833-5.
- Orlacchio, A., G. Bernardi, et al. (2007). "RNA interference as a tool for Alzheimer's disease therapy." *Mini Rev Med Chem* **7**(11): 1166-76.
- Otaka, A., M. Nakamura, et al. (2002). "Remodeling of gp41-C34 peptide leads to highly effective inhibitors of the fusion of HIV-1 with target cells." *Angew Chem Int Ed Engl* **41**(16): 2937-40.
- Otteken, A. and B. Moss (1996). "Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin." *J Biol Chem* **271**(1): 97-103.
- Pal, R., G. M. Hoke, et al. (1989). "Role of oligosaccharides in the processing and maturation of envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(9): 3384-8.
- Palker, T. J., M. E. Clark, et al. (1988). "Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(6): 1932-6.

- Papandreou, M. J., T. Idziorek, et al. (1996). "Glycosylation and stability of mature HIV envelope glycoprotein conformation under various conditions." FEBS Lett **379**(2): 171-6.
- Pastore, C., G. R. Picchio, et al. (2003). "Two mechanisms for human immunodeficiency virus type 1 inhibition by N-terminal modifications of RANTES." Antimicrob Agents Chemother **47**(2): 509-17.
- Percherancier, Y., Y. A. Berchiche, et al. (2005). "Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers." J Biol Chem **280**(11): 9895-903.
- Percherancier, Y., B. Lagane, et al. (2003). "HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains." J Biol Chem **278**(5): 3153-61.
- Perez-Alvarez, L., R. Carmona, et al. (2006). "Long-term monitoring of genotypic and phenotypic resistance to T20 in treated patients infected with HIV-1." J Med Virol **78**(2): 141-7.
- Pleskoff, O., C. Treboute, et al. (1997). "Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry." Science **276**(5320): 1874-8.
- Popik, W., T. M. Alce, et al. (2002). "Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells." J Virol **76**(10): 4709-22.
- Potash, M. J., G. Bentsman, et al. (1998). "Peptide inhibitors of HIV-1 protease and viral infection of peripheral blood lymphocytes based on HIV-1 Vif." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13865-8.
- Poveda, E., B. Rodes, et al. (2005). "Dynamics of enfuvirtide resistance in HIV-infected patients during and after long-term enfuvirtide salvage therapy." J Clin Virol **34**(4): 295-301.
- Proudfoot, A. E., R. Buser, et al. (1999). "Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors." J Biol Chem **274**(45): 32478-85.
- Proudfoot, A. E., C. A. Power, et al. (1996). "Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist." J Biol Chem **271**(5): 2599-603.
- Putral, L. N., W. Gu, et al. (2006). "RNA interference for the treatment of cancer." Drug News Perspect **19**(6): 317-24.
- Qin, X. F., D. S. An, et al. (2003). "Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 183-8.
- Raport, C. J., J. Gosling, et al. (1996). "Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha." J Biol Chem **271**(29): 17161-6.
- Rayner, C. R., L. D. Esch, et al. (2001). "Symptomatic hyperbilirubinemia with indinavir/ritonavir-containing regimen." Ann Pharmacother **35**(11): 1391-5.
- Re, M. C., M. Vignoli, et al. (2001). "Antibodies against full-length Tat protein and some low-molecular-weight Tat-peptides correlate with low or undetectable viral load in HIV-1 seropositive patients." J Clin Virol **21**(1): 81-9.
- Reeves, J. D. and C. A. Derdeyn Entry inhibitors in HIV therapy.
- Reeves, J. D. and C. A. Derdeyn (2007). Entry inhibitors in HIV therapy. Boston, Basel ; Birkhäuser Verlag.
- Reeves, J. D., S. Hibbitts, et al. (1999). "Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with

- HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo." J Virol **73**(9): 7795-804.
- Reeves, J. D., F. H. Lee, et al. (2005). "Enfuvirtide resistance mutations: impact on human immunodeficiency virus envelope function, entry inhibitor sensitivity, and virus neutralization." J Virol **79**(8): 4991-9.
- Rimsky, L. T., D. C. Shugars, et al. (1998). "Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides." J Virol **72**(2): 986-93.
- Rizzuto, C. D., R. Wyatt, et al. (1998). "A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding." Science **280**(5371): 1949-53.
- Roben, P., J. P. Moore, et al. (1994). "Recognition properties of a panel of human recombinant Fab fragments to the CD4 binding site of gp120 that show differing abilities to neutralize human immunodeficiency virus type 1." J Virol **68**(8): 4821-8.
- Rodriguez-Frade, J. M., G. del Real, et al. (2004). "Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor." Embo J **23**(1): 66-76.
- Rosenkilde, M. M., L. O. Gerlach, et al. (2004). "Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor." J Biol Chem **279**(4): 3033-41.
- Royce, R. A., A. Sena, et al. (1997). "Sexual transmission of HIV." N Engl J Med **336**(15): 1072-8.
- Sackett, K. and Y. Shai (2003). "How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain." J Mol Biol **333**(1): 47-58.
- Salghetti, S., R. Mariani, et al. (1995). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56lck protein-tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(2): 349-53.
- Samson, M., O. Labbe, et al. (1996). "Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene." Biochemistry **35**(11): 3362-7.
- Sanders, R. W., M. Venturi, et al. (2002). "The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120." J Virol **76**(14): 7293-305.
- Saphire, E. O., P. W. Parren, et al. (2001). "Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design." Science **293**(5532): 1155-9.
- Sattentau, Q. J. and J. P. Moore (1991). "Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding." J Exp Med **174**(2): 407-15.
- Sattentau, Q. J. and R. A. Weiss (1988). "The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor." Cell **52**(5): 631-3.
- Scanlan, C. N., R. Pantophlet, et al. (2002). "The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120." J Virol **76**(14): 7306-21.
- Schaeffer, E., R. Geleziunas, et al. (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions." J Virol **75**(6): 2993-3000.
- Schols, D. (2004). "HIV co-receptors as targets for antiviral therapy." Curr Top Med Chem **4**(9): 883-93.
- Schwartz, O., V. Marechal, et al. (1996). "Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein." Nat Med **2**(3): 338-42.
- Sia, S. K., P. A. Carr, et al. (2002). "Short constrained peptides that inhibit HIV-1 entry." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14664-9.

- Sia, S. K. and P. S. Kim (2003). "Protein grafting of an HIV-1-inhibiting epitope." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9756-61.
- Sica, A., A. Saccani, et al. (1997). "Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes." J Exp Med **185**(5): 969-74.
- Signoret, N., A. Pelchen-Matthews, et al. (2000). "Endocytosis and recycling of the HIV coreceptor CCR5." J Cell Biol **151**(6): 1281-94.
- Signoret, N., P. Poignard, et al. (1993). "Human and simian immunodeficiency viruses: virus-receptor interactions." Trends Microbiol **1**(9): 328-33.
- Singh, A., G. Besson, et al. (1999). "Patterns of chemokine receptor fusion cofactor utilization by human immunodeficiency virus type 1 variants from the lungs and blood." J Virol **73**(8): 6680-90.
- Song, E., S. K. Lee, et al. (2003). "Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages." J Virol **77**(13): 7174-81.
- Speck, R. F., U. Esser, et al. (1999). "A trans-receptor mechanism for infection of CD4-negative cells by human immunodeficiency virus type 1." Curr Biol **9**(10): 547-50.
- Starcich, B. R., B. H. Hahn, et al. (1986). "Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS." Cell **45**(5): 637-48.
- Stegmann, T., J. M. Delfino, et al. (1991). "The HA2 subunit of influenza hemagglutinin inserts into the target membrane prior to fusion." J Biol Chem **266**(27): 18404-10.
- Stevenson, M. (1996). "Portals of entry: uncovering HIV nuclear transport pathways." Trends Cell Biol **6**(1): 9-15.
- Stevenson, M. (2003). "Dissecting HIV-1 through RNA interference." Nat Rev Immunol **3**(11): 851-8.
- Strebel, K. (2007). "HIV accessory genes Vif and Vpu." Adv Pharmacol **55**: 199-232.
- Stuchell, M. D., J. E. Garrus, et al. (2004). "The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding." J Biol Chem **279**(34): 36059-71.
- Takashima, K., H. Miyake, et al. (2005). "Highly potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by TAK-220, an orally bioavailable small-molecule CCR5 antagonist." Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3474-82.
- Tamamura, H. and N. Fujii (2005). "The therapeutic potential of CXCR4 antagonists in the treatment of HIV infection, cancer metastasis and rheumatoid arthritis." Expert Opin Ther Targets **9**(6): 1267-82.
- Tamamura, H., A. Hori, et al. (2003). "T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer." FEBS Lett **550**(1-3): 79-83.
- Tamamura, H., Y. Xu, et al. (1998). "A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: a strong anti-HIV peptide T140." Biochem Biophys Res Commun **253**(3): 877-82.
- Tan, K., J. Liu, et al. (1997). "Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12303-8.
- Thali, M., J. P. Moore, et al. (1993). "Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding." J Virol **67**(7): 3978-88.
- Tiffany, H. L., L. L. Lautens, et al. (1997). "Identification of CCR8: a human monocyte and thymus receptor for the CC chemokine I-309." J Exp Med **186**(1): 165-70.
- Toth, P. T., D. Ren, et al. (2004). "Regulation of CXCR4 receptor dimerization by the chemokine SDF-1alpha and the HIV-1 coat protein gp120: a fluorescence resonance energy transfer (FRET) study." J Pharmacol Exp Ther **310**(1): 8-17.

- Turner, B. G. and M. F. Summers (1999). "Structural biology of HIV." J Mol Biol **285**(1): 1-32.
- Usami, O., Y. Ashino, et al. (2007). "Efavirenz-induced neurological symptoms in rare homozygote CYP2B6 *2/*2 (C64T)." Int J STD AIDS **18**(8): 575-6.
- Varthakavi, V., R. M. Smith, et al. (2003). "Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 15154-9.
- Vasilescu, A., S. C. Heath, et al. (2003). "Genomic analysis of Th1-Th2 cytokine genes in an AIDS cohort: identification of IL4 and IL10 haplotypes associated with the disease progression." Genes Immun **4**(6): 441-9.
- Veazey, R. S., P. J. Klasse, et al. (2005). "Protection of macaques from vaginal SHIV challenge by vaginally delivered inhibitors of virus-cell fusion." Nature **438**(7064): 99-102.
- Veazey, R. S., R. J. Shattock, et al. (2003). "Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120." Nat Med **9**(3): 343-6.
- Venkatesan, S., J. J. Rose, et al. (2003). "Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4." Mol Biol Cell **14**(8): 3305-24.
- Vermeire, K. and D. Schols (2005). "Cyclotriazadisulfonamides: promising new CD4-targeted anti-HIV drugs." J Antimicrob Chemother **56**(2): 270-2.
- Verrier, F., A. M. Borman, et al. (1999). "Role of the HIV type 1 glycoprotein 120 V3 loop in determining coreceptor usage." AIDS Res Hum Retroviruses **15**(8): 731-43.
- Vila-Coro, A. J., M. Mellado, et al. (2000). "HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3388-93.
- Vita, C., E. Drakopoulou, et al. (1999). "Rational engineering of a miniprotein that reproduces the core of the CD4 site interacting with HIV-1 envelope glycoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13091-6.
- Walker, C. M. and J. A. Levy (1989). "A diffusible lymphokine produced by CD8+ T lymphocytes suppresses HIV replication." Immunology **66**(4): 628-30.
- Wei, P., M. E. Garber, et al. (1998). "A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA." Cell **92**(4): 451-62.
- Wei, X., J. M. Decker, et al. (2002). "Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy." Antimicrob Agents Chemother **46**(6): 1896-905.
- Weissenhorn, W., A. Dessen, et al. (1997). "Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41." Nature **387**(6631): 426-30.
- Welch, B. D., A. P. VanDemark, et al. (2007). "Potent D-peptide inhibitors of HIV-1 entry." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(43): 16828-33.
- Weng, Y. and C. D. Weiss (1998). "Mutational analysis of residues in the coiled-coil domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41." J Virol **72**(12): 9676-82.
- Wild, C., T. Oas, et al. (1992). "A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10537-41.
- Wild, C. T., D. C. Shugars, et al. (1994). "Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 9770-4.

- Willbold, D., S. Hoffmann, et al. (1997). "Secondary structure and tertiary fold of the human immunodeficiency virus protein U (Vpu) cytoplasmic domain in solution." Eur J Biochem **245**(3): 581-8.
- Willey, R. L., F. Maldarelli, et al. (1992). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4." J Virol **66**(12): 7193-200.
- Willey, R. L., F. Maldarelli, et al. (1992). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes." J Virol **66**(1): 226-34.
- Willey, R. L., R. A. Rutledge, et al. (1986). "Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(14): 5038-42.
- Wolfs, T. F., J. J. de Jong, et al. (1990). "Evolution of sequences encoding the principal neutralization epitope of human immunodeficiency virus 1 is host dependent, rapid, and continuous." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 9938-42.
- Wolfs, T. F., G. Zwart, et al. (1991). "Naturally occurring mutations within HIV-1 V3 genomic RNA lead to antigenic variation dependent on a single amino acid substitution." Virology **185**(1): 195-205.
- Xiao, H., C. Neuveut, et al. (2000). "Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(21): 11466-71.
- Xu, L., A. Pozniak, et al. (2005). "Emergence and evolution of enfuvirtide resistance following long-term therapy involves heptad repeat 2 mutations within gp41." Antimicrob Agents Chemother **49**(3): 1113-9.
- Yang, Q. E., A. G. Stephen, et al. (2005). "Discovery of small-molecule human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors that target the gp120-binding domain of CD4." J Virol **79**(10): 6122-33.
- Yarchoan, R., R. W. Klecker, et al. (1986). "Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex." Lancet **1**(8481): 575-80.
- Yuan, W., S. Craig, et al. (2004). "CD4-induced T-20 binding to human immunodeficiency virus type 1 gp120 blocks interaction with the CXCR4 coreceptor." J Virol **78**(10): 5448-57.
- Zennou, V., C. Petit, et al. (2000). "HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap." Cell **101**(2): 173-85.
- Zhang, L., W. Yu, et al. (2002). "Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor." Science **298**(5595): 995-1000.
- Zhang, Y. M., H. Imamichi, et al. (1997). "Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites." J Virol **71**(9): 6662-70.
- Zhao, Q., L. Ma, et al. (2005). "Identification of N-phenyl-N'-(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-yl)-oxalamides as a new class of HIV-1 entry inhibitors that prevent gp120 binding to CD4." Virology **339**(2): 213-25.
- Zhou, N., Z. Luo, et al. (2000). "Molecular modeling and site-directed mutagenesis of CCR5 reveal residues critical for chemokine binding and signal transduction." Eur J Immunol **30**(1): 164-73.
- Zolla-Pazner, S., S. S. Cohen, et al. (2007). "Focusing the immune response on the V3 loop, a neutralizing epitope of the HIV-1 gp120 envelope." Virology.