



HAL
open science

Caractérisation de l'effet des inhibiteurs allostériques de l'interaction IN-LEDGF/p75 (INLAIs) sur la réplication du VIH-1 et du SIV

Céline Amadori

► **To cite this version:**

Céline Amadori. Caractérisation de l'effet des inhibiteurs allostériques de l'interaction IN-LEDGF/p75 (INLAIs) sur la réplication du VIH-1 et du SIV. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB100 . tel-02180561

HAL Id: tel-02180561

<https://theses.hal.science/tel-02180561>

Submitted on 11 Jul 2019

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

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

UNIVERSITE PARIS DESCARTES - PARIS

ECOLE DOCTORALE « Bio Sorbonne Paris Cité – BioSPC »

THESE DE DOCTORAT

Présentée par **Céline AMADORI**

Dirigée par Dr Stéphane EMILIANI

En partenariat avec Richard BENAROUS de la société Mutabilis

Pour l'obtention du grade de : **Docteur de l'Université Paris Descartes**

Discipline/Spécialité : **Biologie Cellulaire et Moléculaire**

**Caractérisation de l'effet des inhibiteurs
allostériques de l'interaction IN-LEDGF/p75
(INLAIs) sur la réplication du VIH-1 et du SIV**

Soutenance prévue le **23 Novembre 2016**

Devant la commission d'examen :

Dr Matteo NEGRONI , Directeur de Recherche, Strasbourg	Rapporteur
Dr Vincent PARISSI , Directeur de Recherche, Bordeaux	Rapporteur
Dr Christiane Moog , Directrice de Recherche, Strasbourg	Examinatrice
Dr Olivier DELELIS , Chargé de Recherche, Paris	Examineur
Dr Pierre-Emmanuel CECCALDI , Professeur des Universités, Paris	Président
Dr Stéphane EMILIANI , Directeur de Recherche, Paris	Directeur de thèse
Dr Richard BENAROUS , Directeur Scientifique chez Mutabilis	Membre invité

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mes travaux et pour le temps qu'ils m'ont accordé: Vincent Parissi, Matteo Negrone, Christiane Moog, Olivier Delelis et Pierre-Emmanuel Ceccaldi.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à mon directeur de thèse Stéphane Emiliani. Merci Stéphane de m'avoir fait confiance et donné l'opportunité de réaliser cette thèse, de m'avoir toujours soutenue et encouragée ainsi que de m'avoir aidée à prendre confiance en moi. Ta disponibilité et tes qualités humaines ont contribué à faire que cette expérience professionnelle soit une belle aventure à vivre.

Je remercie particulièrement Richard Benarous sans qui cette thèse n'aurait également pas été possible. Merci pour tes encouragements, ton encadrement et ton investissement dans mon travail tout au long de ces trois années. Tu as su me pousser à dépasser mes limites notamment en me donnant la chance de faire mes preuves à l'étranger ce qui fut pour moi très enrichissant aussi bien sur le plan professionnel que personnel.

J'exprime également ma gratitude à l'ensemble du groupe Mutabilis qui m'a permis d'être rapidement et facilement intégrée. Merci à François de m'avoir accueillie au sein de l'équipe, à Erwann d'avoir toujours pris le temps de m'écouter et de discuter, à Jean-Michel d'avoir participé au projet et à Armelle pour son aide.

Un immense merci à toutes les personnes qui ont fait ou font partie de l'équipe, tous à votre manière vous avez contribué au fait que je me sente si bien durant ces trois années passées à Cochin. Mon challenge ? Être brève et concise car vous connaissez tous ma fâcheuse tendance à rédiger des messages en minimum quatre grandes parties et huit sous parties... Je remercie chaleureusement Sarah qui m'a encadrée dès mes premiers pas au laboratoire et qui ne cesse de m'encourager encore aujourd'hui et Agathe qui est passée pour moi de mentor, à collègue, puis à maman et amie. Merci à mon cher co-doctorant Ahmed avec qui ce fut un privilège de me chamailler nuits et jours ainsi qu'à Sarah, ma partenaire de réalisations artisanales en tout genre qui m'a ouvert l'esprit avec sa vision « décalée ». Aux KGP, Greg et Kostas, qui ont su me soutenir tout au long de ma thèse aussi bien au niveau de problèmes informatiques, linguistiques ou même d'anxiété chronique. Niçois, grec, vous êtes au top ! A Olivier l'hybride mi-homme mi-robot qui s'arrête toujours dans sa course lorsque tu as besoin d'aide, Aurélia qui a toujours le petit mot réconfortant, Mélanie et sa bonne humeur constante et communicative, sans oublier Ursula Ma Ma Ma Ma Madjo Ma Ma Madjo. Mais également à Stéphane Fremont et Antoine, le Millet, qu'il est toujours agréable de revoir pour diverses activités festives et sportives. Je remercie Manu, notre encyclopédie humaine, toujours plein de sagesse, de patience et de gentillesse. Mais aussi Katy qui, témoin de nos frasques nocturnes, a accepté pour nous de se transformer en caméraman et Clarisse qui nous laisse exprimer toute notre créativité lors de l'organisation d'animations ludiques comme celles de fin d'année. Manon, Nico, Sof et S.Lambert, Florian, Rajaa, Vanessa et Monica sans vous aussi cette expérience n'aurait pas été la même. Et je fais confiance aux nouvelles recrues Marc, José et Sophie qui j'en suis convaincue sauront prendre le relai pour que cette ambiance de travail reste aussi bonne.

C'est avec beaucoup d'émotions que je repense aux moments où vous m'avez tant soutenue, fait rire et même parfois consolée. Bref, merci de m'avoir si bien entourée durant ces trois années.

J'adresse mes plus sincères remerciements à José Gatell et toute son équipe qui m'ont très chaleureusement accueillie durant mon séjour à Barcelone. Toute ma reconnaissance à Montse avec qui ce fut un réel plaisir de travailler, de discuter et d'en apprendre un peu plus sur la culture catalane, ainsi qu'à Laïa pour tous nos échanges en « catal-fran-glais » autour de sujets aussi bien culinaires que créatifs. Alberto, Nuria, Manu, Laura, Olivia, Cristina, Amanda... A vous tous: Moltes Gràcies !

Je souhaite également remercier celles et ceux qui ont été près de moi durant tout mon parcours, des bancs de la fac niçoise à ma vie parisienne. Une pensée toute particulière pour Manon qui depuis bien des années maintenant a été d'un soutien sans faille ainsi que pour Ophélie et Sophie avec qui j'ai passé tant de bons moments loin du monde scientifique. Merci d'être toujours là pour moi. Sans oublier Loïc qui, malgré ce qu'il veut bien laisser croire, me prête toujours une oreille attentive. Merci également à Flora, Selda, Valentin et Marie car chacun à votre manière vous avez fait partie de cette aventure.

Je ne peux conclure ces remerciements sans adresser toute ma gratitude à mes supporters de la première heure, mes parents. Leur présence, leur bienveillance, les encouragements et le réconfort dont ils ont toujours su faire preuve ont contribué à faire de moi ce que je suis. Je remercie également mes grands-parents pour tout leur soutien et leur affection.

Enfin mes dernières lignes sont pour ma petite sœur, Romane, qui me supporte et m'encourage dans chacune des choses que j'entreprends. Merci d'avoir tant cru en moi, y compris lorsque moi-même je n'y croyais plus, tu vois j'ai fini par l'écrire cette thèse !

RESUME

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est l'agent causal de la pandémie du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Les rétrovirus ont la capacité de rétro-transcrire leur génome ARN en ADN afin qu'il soit intégré dans celui de l'hôte. Les traitements antirétroviraux (ART) actuels combinent plusieurs classes d'antirétroviraux (ARV) ciblant majoritairement les enzymes virales nécessaires à la réplication du VIH-1: la reverse transcriptase (RT), la protéase (PR) et l'intégrase (IN). L'émergence et la transmission de virus multirésistants à l'ensemble des ARV illustrent la nécessité de développer de nouveaux mécanismes thérapeutiques. Les inhibiteurs catalytiques d'IN (INSTIs) utilisés dans les ART ciblent le site actif de l'enzyme et empêchent ainsi la réaction de transfert de brin de l'intégration du VIH-1. La protéine cellulaire Lens Epithelium-Derived Growth Factor (LEDGF/p75), liée à la chromatine, est l'un des principaux cofacteurs de IN. En permettant le ciblage de l'intégration dans des régions actives du génome de l'hôte, l'interaction IN-LEDGF joue un rôle crucial pour la réplication effective du VIH-1 ce qui en fait une cible de premier ordre pour de nouvelles thérapies.

Au cours de ces dernières années, des inhibiteurs allostériques de l'interaction IN-LEDGF (INLAIs encore appelés LEDGINs ou ALLINIs) ont été développés afin d'inhiber l'étape d'intégration. De manière inattendue, ces molécules exercent de fait une double activité antirétrovirale. En effet les INLAIs ciblent l'intégration mais possèdent également une seconde activité plus efficace sur les étapes tardives de la réplication du VIH-1. Celle-ci se traduit par la production de virions présentant un défaut d'infectivité. Mon projet de thèse, réalisé en partenariat avec la société biopharmaceutique Mutabilis, s'est intéressé à la caractérisation de l'activité antirétrovirale d'une nouvelle classe d'INLAIs selon deux axes: (1) l'approfondissement des mécanismes d'action de ces INLAIs sur les étapes tardives de la réplication du VIH-1 ; (2) l'appréciation de leur spectre d'activité sur la réplication du virus de l'immunodéficience simienne (SIV).

J'ai pu montrer que les virions produits en présence d'INLAIs développées par Mutabilis présentent un défaut de transcription inverse lors de l'infection des cellules cibles, qui les rend non infectieux. Ces molécules n'influencent pas les étapes tardives de maturation protéique et d'empaquetage de l'ARN du VIH-1 dans les virions. De façon intéressante, ces virions non infectieux sont efficacement reconnus par un panel d'anticorps neutralisants spécifiques de l'enveloppe virale du VIH-1 et conservent la capacité d'induire une réponse immunitaire T CD4+ de type Th1 dans des cellules de patients infectés. Nous avons également évalué l'effet des INLAIs sur la réplication du SIV. Des expérimentations *in vitro* ont permis de montrer que certaines INLAIs inhibent efficacement l'interaction IN-LEDGF mais n'induisent pas la multimérisation anormale de IN SIV contrairement à ce que nous observons pour IN VIH-1. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* et indiquent que si certaines INLAIs de seconde génération montrent une activité antirétrovirale au cours des étapes précoces, elles ne sont pas capables d'inhiber efficacement les étapes tardives de la réplication du SIV. De fait, la production de virions SIV en présence de ces INLAIs n'entraîne qu'une faible diminution de leur infectivité.

Mes travaux ont donc permis de mettre en évidence que les virions "inactivés" par ces INLAIs pourraient représenter un nouveau type d'immunogènes pour l'établissement d'une réponse immunitaire anti VIH-1. Cependant l'étude du spectre d'activité suggère que bien que la capacité de certaines INLAIs à inhiber l'interaction IN-LEDGF/p75 semble relativement bien conservée entre le VIH-1 et SIV, elles sont peu efficaces sur les étapes tardives du cycle de réplication du SIV.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	1
RESUME.....	3
TABLE DES MATIERES	5
INDEX DES ILLUSTRATIONS	9
INDEX DES TABLES	10
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
ABREVIATIONS RELATIVES AUX ACIDES AMINES.....	15
INTRODUCTION.....	17
I - Virus de l'immunodéficience humaine (VIH).....	19
A - Généralités sur le VIH-1	19
1. Historique de l'infection	19
2. Classification dans l'ordre viral	19
3. Structure de la particule virale VIH-1	21
4. Les protéines virales	22
a) Les protéines de structure et enzymes virales	22
b) Les protéines régulatrices.....	22
c) Les protéines auxiliaires	23
5. Organisation génomique, transcrits et précurseurs polypeptidiques du VIH-1	25
B - Le cycle de réplication du VIH-1	28
1. Les étapes précoces	28
a) L'attachement et l'entrée du virus dans la cellule hôte	28
b) La décapsidation et la transcription inverse	30
c) L'import nucléaire et l'intégration	32
2. Les étapes tardives	34
II - Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA)	37
A - Epidémiologie.....	37
1. Pandémie.....	37
2. Physiopathologie en absence de traitement	38
3. Les thérapies ART.....	40
a) Historique et évolution des traitements anti VIH.....	40
b) Déclin de la virémie sous thérapie ART	41
c) La thérapie préventive	43
B - Les différentes classes actuelles d'antirétroviraux.....	44

1.	Les inhibiteurs d'entrée	44
2.	Les inhibiteurs de la transcription inverse.....	46
3.	Les inhibiteurs de l'intégrase	47
4.	Les inhibiteurs de protéase	47
C -	Les limites des traitements actuels.....	48
1.	La variabilité génétique	48
2.	Les mutations de résistance.....	49
3.	Les réservoirs viraux	50
III -	Interaction IN-LEDGF : cible des INLAIs.....	51
A -	L'intégrase du VIH-1.....	51
1.	Les étapes de l'intégration.....	51
a)	La réaction 3' processing et l'auto-intégration	52
b)	Le ciblage de l'ADN génomique et la réaction de transfert de brin	53
c)	La réparation de l'ADN et la production de formes non intégrées	54
2.	Les autres activités impliquant l'IN	57
3.	La structure protéique de l'IN	58
a)	Le domaine NTD.....	59
b)	Le domaine CCD	60
c)	Le domaine CTD.....	60
4.	La multimérisation fonctionnelle de l'IN	61
5.	Les protéines impliquées dans le PIC et dans l'intégration	64
a)	Les cofacteurs viraux.....	64
b)	Les cofacteurs cellulaires.....	65
B -	La protéine cellulaire LEDGF/p75.....	68
1.	La structure et le rôle physiologique de LEDGF	68
2.	Le rôle de LEDGF lors de l'infection VIH-1	71
3.	La structure de l'interface entre IN-LEDGF.....	73
C -	Les inhibiteurs de l'intégrase	76
1.	Les inhibiteurs catalytiques de l'IN (INSTIs)	76
a)	Le mécanisme d'action des INSTIs.....	76
b)	Les mutations de résistance aux INSTIs.....	78
2.	Les inhibiteurs allostériques de l'interaction IN-LEDGF (INLAIs)	82
a)	Une nouvelle classe d'antirétroviraux ciblant l'IN	82
b)	Le mécanisme d'action des INLAIs	84
c)	L'action des INLAIs au cours du cycle réplication du VIH-1	86
d)	Les perspectives thérapeutiques	90

IV -	Un modèle simien pour l'étude du VIH-1	93
A -	Le virus de l'immunodéficience simienne (SIV)	93
1.	La zoonose : transmission du singe à l'Homme.....	93
2.	Origines et réservoirs simiens du VIH.....	95
3.	La répartition des différents groupes du VIH-1	96
B -	Immunopatogénicité de l'infection SIV	97
1.	Histoire naturelle de l'infection SIV	97
2.	Un modèle adapté pour l'infection VIH chez l'Homme	98
C -	Un modèle d'étude des inhibiteurs d'intégrase	101
1.	Généralités SIV	101
2.	La comparaison des IN VIH-1 et SIV	101
3.	Etude de l'effet des inhibiteurs d'IN sur l'infection SIV	104
V -	Système immunitaire et VIH-1	105
A -	Le tropisme du VIH-1	105
1.	Les modes de transmission.....	105
2.	Les cellules du système immunitaire	106
a)	Les cellules dendritiques.....	107
b)	Les lymphocytes T	108
c)	Les lymphocytes B.....	109
d)	Les autres cellules immunitaires	109
3.	Les stratégies vaccinales	110
	OBJECTIFS DE MES TRAVAUX DE THESE	113
	RESULTATS.....	117
I -	Inhibition de deux étapes distinctes du cycle de réplication du VIH-1 par les INLAIs	119
II -	Défaut d'Infectivité et maintien de l'immunogénicité de virions VIH-1 produits en présence d'INLAIs	121
A -	La présence d'INLAIs ne modifie pas la dimérisation et le packaging de l'ARN viral dans les virions	121
B -	Les virions produits en présence d'INLAIs conservent leur immunogénicité	121
1.	Immunoréactivité de type B	122
2.	Immunoréactivité de type T	122
III -	Evaluation de l'activité antirétrovirale de différents INLAIs sur la réplication du SIV.	125
A -	Les INLAIs inhibent la liaison LEDGF sur IN SIV <i>in vitro</i>	125
B -	L'efficacité limitée des INLAIs sur la réplication du SIV	133
C -	L'efficacité limitée des INLAIs sur la production et l'infectivité de virions SIV	136

D - Les INLAIs n'induisent pas la multimérisation IN SIV <i>in vitro</i>	139
E - Les INLAIs inhibent les étapes précoces de la réplication SIV	145
F - Les virus SIV mutants pour IN au niveau du site d'interaction avec LEDGF présentent un défaut d'infectivité.....	147
MATERIEL ET METHODES	151
DISCUSSION ET CONCLUSION	159
I - Mécanisme d'action des INLAIs : inhibition de deux étapes distinctes de la réplication du VIH-1	162
II - Etude structurale des virus VIH-1 inactivés par les INLAIs et de leur réactivité immunologique.....	164
A - Les INLAIs induisent la production de virions eccentrices défectueux en infectivité.....	164
B - Les INLAIs, potentiels agents thérapeutiques aux multiples facettes.....	167
III - Un modèle simien envisageable pour l'activité des INLAIs ?.....	170
REFERENCES	175

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Structure de la particule virale VIH-1.	21
Figure 2 : Organisation du génome intégré du VIH-1.....	25
Figure 3 : Génome, transcrits et protéines du VIH-1.....	27
Figure 4 : Le cycle de réplication du VIH-1.	28
Figure 5 : Reconnaissance et entrée de la particule virale VIH-1 dans la cellule cible.	29
Figure 6 : Différentes étapes de la transcription inverse du VIH-1.	32
Figure 7 : Assemblage et bourgeonnement de particules virales VIH-1.....	36
Figure 8 : Pandémie mondiale de l'infection au VIH.....	37
Figure 9 : les différentes phases cliniques de l'infection par le VIH-1.....	39
Figure 10 : Déclin de la virémie sous traitement ART.	42
Figure 11 : Les étapes du cycle de réplication du VIH-1 ciblées par les différentes classes d'antirétroviraux.	44
Figure 12 : Différentes réactions enzymatiques de l'intégration du génome viral VIH-1.	51
Figure 13 : Les différentes formes d'ADN viral non intégrées.	56
Figure 14 : les différents domaines fonctionnels de l'IN du VIH-1.	58
Figure 15 : Structure du complexe IN-ADN du PFV.....	62
Figure 16 : Organisation structurelle des protéines HRP dont LEDGF/p75.....	69
Figure 17 : Interaction en l'IN et LEDGF lors de l'étape d'intégration du VIH-1.	72
Figure 18 : interface entre IBD LEDGF et CCD IN.....	73
Figure 19 : Modélisation des interactions entre IN, ADN viral et LEDGF.....	75
Figure 20 : structures chimiques des INSTIs RAL, EVG et DTG.....	76
Figure 21 : Localisation sur le domaine CCD IN des résidus impliqués dans la résistance aux inhibiteurs catalytiques RAL et EVG.	80
Figure 22 : Structure chimique des INLAIs BI-D, LEDGIN6 et LEDGIN7.	84
Figure 23 : Comparaison de la liaison du domaine IBD LEDGF ou des INLAIs sur un dimère CCD IN.....	85
Figure 24 : structure des virions produits en présence de différentes classes d'antirétroviraux.....	88
Figure 25 : Origines des virus VIH-1 et VIH-2.....	94
Figure 26 : Comparaison des événements associés à l'infection SIV naturelle ou à l'infection expérimentale pathogène SIV similaire à celle du VIH.....	99
Figure 27 : Alignement de séquences de l'IN VIH-1, VIH-2 et SIV.....	102
Figure 28 : Structure partielle de l'IN SIV.....	103
Figure 29 : Dissémination du VIH-1 et infection des cellules du système immunitaire.	106
Figure 30 : Production de protéine IN-His SIV et principe du test d'interaction LEDGF-IN <i>in vitro</i>	126
Figure 31 : Mise au point des expérimentations HTRF afin d'étudier l'interaction LEDGF-IN VIH-1 ou SIV <i>in vitro</i>	128
Figure 32 : Interaction LEDGF-IN VIH-1 ou SIV en présence d'une gamme croisée de chacun des partenaires.	129
Figure 33 : Interaction <i>in vitro</i> entre LEDGF et l'IN du VIH-1 ou du SIV en présence d'INLAIs.....	131
Figure 34: Réplication du VIH-1 et du SIV en multiples cycles d'infection en présence d'INLAIs.....	134
Figure 35 : Infectivité de virions VIH-1 ou SIV produits en présence d'INLAIs.	137

Figure 36 : Production de protéine IN-Flag SIV et principe du test de multimérisation IN-IN <i>in vitro</i> .	140
Figure 37 : Mise au point des expérimentations HTRF afin d'étudier la multimérisation IN-IN VIH-1 ou SIV <i>in vitro</i> .	141
Figure 38 : Multimérisation <i>in vitro</i> de l'IN du VIH-1 ou du SIV en présence d'INLAIs.	144
Figure 39 : Réplication du VIH-1 et du SIV en cycle unique d'infection en présence d'INLAIs.	146
Figure 40 : Caractérisation de la production de SIV porteur de 5 mutations de l'IN.	149

INDEX DES TABLES

Tableau 1 : Classification des <i>Retroviridae</i> .	20
Tableau 2 : Activité de différents INLAIs sur l'interaction <i>in vitro</i> IN-LEDGF du VIH-1 et du SIV.	132
Tableau 3 : Activité de différents INLAIs la réplication en multiples cycles d'infection du VIH-1 et du SIV.	135
Tableau 4 : Activité de différents INLAIs sur la multimérisation <i>in vitro</i> IN-IN du VIH-1 et du SIV.	143
Tableau 5 : Activité de différents inhibiteurs de l'IN sur les étapes précoces de la réplication du VIH-1 et du SIV.	147
Tableau 6 : Titres et concentrations de différents virus SIV mutants de l'IN.	148
Tableau 7 : Liste des amorces utilisées.	157

LISTE DES ABREVIATIONS

μM : micromolaire

AC50 : half maximal activation concentration

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNt : ARN de transfert

ARNv : ARN viral

ALLINI : allostéric integrase inhibitor

ART : antiretroviral therapy

BI : Boehringer Ingelheim

bNAPs : broadly neutralizing antibodies

CA : capsid

CCD : catalytic core domain

CCR5 : C-C chimiokine receptor type 5

CD4 : cluster of differentiation 4

CTD : C-terminal domain

CXCR4 : C-X-C chimiokine receptor type 4

DC : cellule dendritique

DMSO : diméthylsulfoxyde

DTG : dolutegravir

EC50 : half maximal effective concentration

EVG : elvitegravir

GST : Glutathione S-transferase

HAART : Highly Active Antiretroviral Therapy

HTRF : Homogeneous Time Resolved Fluorescence

IBD : integrase binding domain

IC50 : half maximal inhibitory concentration

IFN : interferon

IL : interleukine

IN : integrase

INLAI : IN-LEDGF allosteric inhibitor

INSTI : Integrase strand transfert inhibitor

LEDGF : Lens epithelial derived growth factor

LEDGIN : LEDGF inhibitor

LT : lymphocyte T

MA : matrice

MINI : multimeric IN inhibitor

moi : multiplicity of infection

MR : multiple rounds

NC : nucleoprotein

nM : nanomolaire

NCINI : Non-Catalytic IN Inhibitor

NRTI : nucleoside/nucleotide reverse-transcriptase inhibitor

NNRTI : non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor

NTD : N-terminal domain

PBMC : peripheral blood mononuclear cell

PFV : Prototype Foamy virus

PI : protease inhibitor

PIC : pre integration complex

PR : protease

RAL : Raltegravir

RNP : ribonucleoprotein

RRE : Rev responsive element

RT : reverse transcriptase

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

SHIV : Simian/Human immunodeficiency virus

SIV : Simian human immunodeficiency virus

SIVmac : SIV macaque

SIVcpz : SIV chimpanzé

SR : single round

TAR : transactivator of transcription

TCID50 : 50% tissue culture infective doses

VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine de type 1

VIH-2 : Virus de l'immunodéficience humaine de type 2

WT : wild type

ABREVIATIONS RELATIVES AUX ACIDES AMINES

Acide glutamique	Glu	E
Acide aspartique	Asp	D
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I - Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

A - Généralités sur le VIH-1

1. Historique de l'infection

En 1981 à Los Angeles, plusieurs jeunes patients décèdent des suites d'infections opportunistes inhabituelles associées à des tumeurs cutanées provoquées par le sarcome de Kaposi [1]. Cette nouvelle pathologie est dès lors décrite sous le nom de syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA).

L'augmentation rapide du nombre de patients infectés et le fait que cette pathologie soit transmissible par voie sexuelle et sanguine permet de suspecter un pathogène viral comme étant à l'origine de cette maladie. La similitude au niveau des symptômes, des voies de transmission et de l'épidémiologie avec le virus HTLV (Human T-Cell Lymphotropic Virus) mène les chercheurs sur la piste des rétrovirus.

Il fallut attendre deux ans pour que l'agent causal du SIDA soit isolé et décrit comme un nouveau rétrovirus ne faisant pas parti de la famille des HTLV. Suite à la compétition internationale dans le domaine, il sera baptisé LAV (Lymphadenopathy-associated virus) [2], HTLV-III [3,4] ou ARV (AIDS-associated Retrovirus) [5]. Un consensus est enfin défini en 1986 sur le nom de virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [6].

La même année, un virus morphologiquement similaire au VIH mais présentant des antigènes différents est décrit comme virus de l'immunodéficience de type 2 (VIH-2) [7]. Le VIH-2 est moins transmissible et moins pathogène que son homologue responsable de l'épidémie mondiale du SIDA décrit jusqu'à présent et désormais nommé VIH-1.

2. Classification dans l'ordre viral

Les virus sont des agents infectieux de petite taille. Ils sont considérés comme des parasites car la machinerie cellulaire de l'hôte leur est indispensable pour se répliquer. Il existe une très grande diversité de virus extrêmement divergents au niveau de leur structure, leur génome, leur cible...

La classification de Baltimore a permis d'organiser les virus en différents groupes en fonction de la nature de leur appareil génétique (ADN ou ARN, simple ou double brin), de la polarité de leur génome (positive ou négative) et de leur capacité de transcription inverse. Le VIH possédant un génome d'ARN simple brin de polarité positive pouvant être rétrotranscrit en ADN double brin. Les VIH-1 et VIH-2 sont des virus de la famille des *Retroviridae* (groupe IV de la classification de Baltimore).

L'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) a répertorié sept genres de rétrovirus. Ces genres sont subdivisés en deux catégories, simple ou complexe, selon la présence ou l'absence dans leur génome de gènes dits auxiliaires. Les VIH-1 et VIH-2 sont des rétrovirus complexes appartenant au genre des Lentivirus (en latin virus lent) étant à l'origine d'une pathologie à évolution lente, progressive et persistante (tableau 1).

Tableau 1 : Classification des *Retroviridae*

Sous famille	Genre	Exemple de virus	Génome
Orthoretrovirinae	Alpharetrovirus	Avian Leukosis Virus (ALV) Rous Sarcoma Virus (RSV)	simple
	Betaretrovirus	Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)	
	Gammaretrovirus	Murine Leukemia Virus (MLV)	
	Deltaretrovirus	Human T Cell Leukemia Virus (HTLV)	complexe
	Epsilonretrovirus	Walleye Dermal Sarcoma Virus (WDSV)	
	Lentivirus	Human Immunodeficiency Virus (HIV) Simian Immunodeficiency Virus (SIV)	
Spumaretrovirinae	Spumavirus	Human Foamy Virus (HFV) Prototype Foamy virus (PFV)	

Dans la suite de cette première sous partie de mon manuscrit nous allons nous intéresser plus particulièrement aux caractéristiques du virus VIH-1. La description des différents constituants du virus est faite dans un ordre décroissant en partant de la structure de la particule virale, puis des protéines virales arborant des fonctions variées, aussi bien dans l'architecture du virion que dans la réplication du VIH-1, pour finir par la composition du génome viral codant pour plusieurs précurseurs polypeptidiques à l'origine des multiples protéines virales.

3. Structure de la particule virale VIH-1

La structure de la particule virale VIH-1 possède une morphologie sphérique de 80 à 100 nm de diamètre caractéristique des *Retroviridae*. Il s'agit de virus enveloppés d'une bicouche lipidique, originelle de la cellule hôte, dans laquelle sont ancrés des spicules viraux. Un spicule est formé d'un tétramère de deux types de glycoprotéines virales : la glycoprotéine transmembranaire gp41 ancrée dans l'enveloppe virale et la glycoprotéine extracellulaire gp120 [8].

Les virions VIH-1 matures renferment un « core » viral conique apparaissant dense aux électrons en microscopie électronique (figure 1A) [9]. La protéine virale de matrice (MA, p17) située au niveau de la surface interne de l'enveloppe fait le lien avec le core de la particule composé de protéines virales de capsid (CA, p24). La capsid sous forme conique renferme deux copies d'ARN viral simple brin associées à des protéines de nucléocapsid (NC, p7). Les enzymes virales nécessaires aux étapes précoces de la réplication du VIH-1 sont également présentes dans le virion : la protéase (PR, p12), la transcriptase inverse (RT, p66/p51) et l'intégrase (IN, p32) (figure 1B).

De nombreuses protéines cellulaires jouant un rôle dans l'assemblage, la maturation fonctionnelle et l'infectivité des virions sont également incorporées dans les particules virales VIH-1 [10].

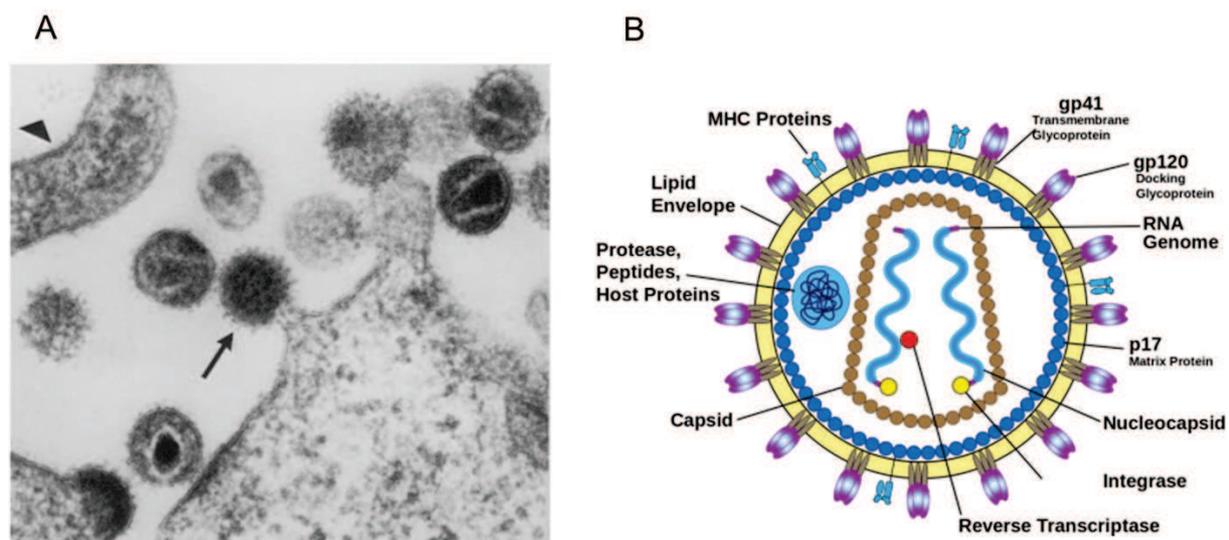


Figure 1 : Structure de la particule virale VIH-1.

(A) Différentes étapes de la maturation du VIH-1 en microscopie électronique [9]. (B) Schéma du virion mature.

4. Les protéines virales

a) *Les protéines de structure et enzymes virales*

La protéine extracellulaire gp120, reliée à l'enveloppe virale par son interaction avec la protéine transmembranaire gp41, interagit avec le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 permettant ainsi la fusion des membranes virale et cellulaire [11,12].

La protéine de matrice (MA) joue un rôle dans l'assemblage des particules virales notamment dans le recrutement de protéines d'enveloppe au niveau de la membrane plasmique [13,14]. La protéine de capsid (CA) protège l'ARN viral en formant le core de la particule virale, via une interaction de ses domaines C-term en homodimères et de ses domaines N-term en hexa et pentamères selon un équilibre dynamique [15,16,17]. La protéine de nucléocapsid (NC), capable de se lier aux acides nucléiques grâce à son motif en doigt de zinc, stabilise l'ARN dans la capsid virale du virion mature [18]. Mais elle est également impliquée dans d'autres étapes de la réplication du VIH-1 telles que la transcription inverse et l'intégration [19,20]. Les protéines MA, CA et NC sont suffisantes pour induire le bourgeonnement de particules immatures VLP (virus-like particle) [21].

Le génome viral VIH-1 code également pour plusieurs enzymes virales. La protéase (PR) permet la maturation par clivage de polypeptides viraux, étape essentielle à l'infectivité des virions néosynthétisés. La transcriptase inverse (RT) est un hétérodimère composé de sous unités p66 et p51. Elle possède une activité ADN polymérase ARN/ADN dépendante en N-term et une activité RNase H en C-term. Cette double activité enzymatique confère à la RT la capacité de synthèse d'ADN double brin à partir du génome viral ARN simple brin et la capacité de dégradation de cet ARN matrice [22,23]. Enfin l'intégrase (IN) catalyse l'étape d'intégration de cet ADN rétrotranscrit dans des régions transcriptionnellement actives de l'ADN génomique de la cellule hôte.

b) *Les protéines régulatrices*

Les *Retroviridae* ayant un génome complexe, ils possèdent également des protéines supplémentaires essentielles à la réplication virale. Pour le VIH-1 il s'agit des protéines Tat, p14 (transactivator of transcription) et Rev, p19 (Regulator of expression of viral proteins).

Tat est l'une des premières protéines virales synthétisées. Il s'agit d'un transactivateur de la transcription de l'ADN viral une fois intégré, de façon stable et non réversible, dans l'ADN

génomique de la cellule hôte. Sa fixation sur le domaine TAR (transactivation response) dans la région 5' de l'ARN viral permet le recrutement de ses cofacteurs cellulaires, tel que la cycline T1, induisant la production de transcrits viraux [24].

La protéine Rev possède à la fois un domaine NLS (nuclear localization signal) et un NES (nuclear export signal) lui permettant de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme des cellules hôtes. Son site de fixation est le motif RRE (Rev response element), structure en tige boucle stable présente sur les ARN viraux non et mono-épissés, permettant ainsi l'export de l'ARN génomique non épissé et des transcrits viraux mono épissés vers le cytoplasme. Il a été mis en évidence que le processus d'export de l'ARN viral Rev-dépendant nécessite également la présence de protéines cellulaires comme Crm-1 [25,26]. La protéine Rev joue également un rôle dans la traduction des ARN viraux en augmentant l'association de polysomes suite à sa fixation sur le domaine RRE [27].

c) Les protéines auxiliaires

Les protéines auxiliaires, non nécessaires pour une réplication minimale du VIH-1, ont des rôles variés ayant pour but d'augmenter l'infectivité des particules virales. Elles sont notamment impliquées dans l'échappement de la reconnaissance par le système immunitaire et contrecarrent l'action des facteurs de restriction mis en place par la cellule hôte pour limiter l'infection. La composition en protéines auxiliaires diffère entre les différents lentivirus, mais chez le VIH-1 elles sont au nombre de quatre : Vif p23 (viral infectivity factor), Vpr, p15 (viral protein r), Vpu, p16 (viral protein u) et Nef, (negative factor).

Un des rôles essentiels de la protéine Vif est de contrecarrer les défenses mises en place par la cellule hôte pour limiter l'infection. En effet, Vif empêche l'action du facteur de restriction cellulaire APOBEC3G (APOlipoprotein B Editing Catalytic sub-unit like 3G) capable d'induire des hypermutations dans le génome viral. La fixation de Vif sur APOBEC3G entraîne le recrutement d'un complexe d'ubiquitine ligase permettant ainsi leur dégradation mutuelle par le protéasome [28,29]. APOBEC3G étant plus fortement dégradé, son empaquetage dans la particule virale est drastiquement diminué ce qui augmente l'infectivité des virions néosynthétisés [30]. Une activité indépendante de la machinerie de dégradation cellulaire de Vif sur la prévention de l'encapsidation des protéines de la famille APOBEC3 a également été démontrée [31].

La protéine Vpr, incorporée dans la particule virale, semble posséder de multiples activités dans les étapes précoces de la réplication du VIH-1 qui ne sont pas encore toutes bien

définies. Elle est notamment impliquée dans l'arrêt des cellules cibles en phase G2/M permettant la mise en place d'un environnement favorable à une transcription optimale du VIH-1 [32]. Vpr est également capable de se lier à un facteur cellulaire, la kinase TAK1, de la voie NF- κ B et stimule la sécrétion de la cytokine TNF (tumor necrosis factor) [33]. De plus, il a été démontré que Vpr fait partie du PIC (preintegration complex) [34] mais son rôle dans l'import nucléaire est très controversé .

La protéine Vpu contrecarre l'activité d'un autre facteur de restriction cellulaire dans les étapes tardives de l'infection. La protéine transmembranaire BST2 possède la capacité de séquestrer les virions en cours de synthèse à la membrane plasmique empêchant ainsi leur relargage dans le milieu extracellulaire. Vpu utilise différents mécanismes pour contrecarrer l'action antivirale de BST-2. En effet, Vpu altère le trafic intracellulaire de BST2 en modifiant son recyclage des endosomes vers la membrane plasmique et en inhibant l'adressage des protéines BST-2 en cours de synthèse à la surface cellulaire [35]. Vpu augmente la dégradation de BST2 par la voie lysosomale [36], modifie la distribution de BST2 au niveau du site de bourgeonnement et inhibe la capacité de BST-2 à activer la voie NF- κ B. L'ensemble des mécanismes mis en place par Vpu pour contrecarrer BST-2 n'est pas encore entièrement déterminé, et certains sont encore soumis à controverse, cependant l'action de Vpu sur BST-2 est corrélée à une libération plus efficace des virions. Vpu joue également un rôle dans l'échappement à la réponse immunitaire en induisant notamment la régulation négative de l'expression des récepteurs de surface CD4 [37] ainsi qu'en diminuant l'expression de surface du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I).

Enfin la protéine Nef est également multifonctionnelle et intervient à la fois dans les étapes précoces et tardives de la réplication du VIH-1. Nef diminue l'expression à la surface membranaire des molécules CD4 et des complexes d'histocompatibilité (CMH I et CMH II) afin d'éviter la létalité induite par une surinfection virale et de diminuer la réponse immunitaire [38]. Nef agit également lors de l'assemblage et le bourgeonnement en augmentant l'infectiosité des virions néosynthétisés [39,40]. Des études plus récentes ont permis d'identifier les protéines cellulaires transmembranaires SERINC3 et SERINC5 (proteins serine incorporator) comme de nouveaux facteurs de restriction du VIH-1. Nef contrecarre l'action des SERINC3 et SERINC5 en empêchant leur incorporation dans les particules virales ce qui permet d'augmenter l'infectivité des virions néosynthétisés [41,42].

5. Organisation génomique, transcrits et précurseurs polypeptidiques du VIH-1

La caractérisation du génome viral du VIH-1 débuta en 1984 suite à son clonage et à son séquençage complet l'année suivante [43,44].

Le génome viral du VIH-1 est retrouvé dans la particule virale sous forme de deux copies d'ARN simple brin coiffé et polyadénylé. Suite à la transcription inverse de l'un des deux brins, l'ADN viral double brin ainsi produit sera intégré dans le génome de l'hôte et nommé provirus. Le provirus du VIH-1 a une taille d'environ 10 kb et code pour les différentes protéines virales (figure 2).

Les régions codantes du provirus sont encadrées par des séquences répétées non codantes LTR (Long terminal repeat) en 5' et en 3'. Ces extrémités LTR, constituées de régions U3, R et U5, sont essentielles pour l'intégration et la transcription du provirus [45].

Les gènes *gag*, *pol* et *env* codent respectivement pour les protéines de structure, les enzymes et les protéines d'enveloppe virales communes aux *Retroviridae* simples et complexes. Le gène *gag* code pour les protéines de structure (MA, CA, NC et p6), le gène *pol* pour les enzymes virales (PR, RT et IN) et le gène *env* pour les protéines d'enveloppe (gp120 et gp41) décrites précédemment.

Dans le provirus du VIH-1 s'ajoute des gènes codants pour les protéines régulatrices (Tat et Rev) ainsi que pour les protéines accessoires (Vif, Vpr, Vpu et Nef) également décrites dans la partie précédente.

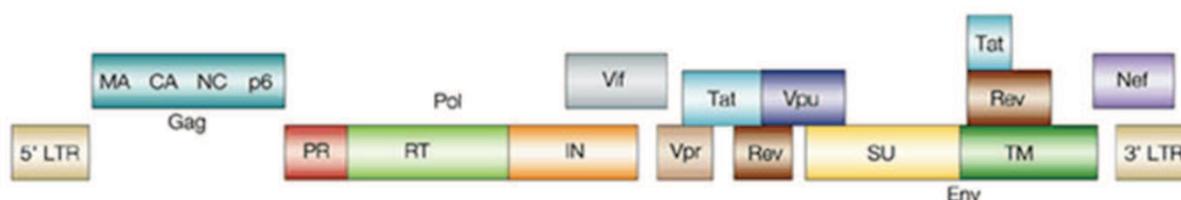


Figure 2 : Organisation du génome intégré du VIH-1 [46].

La transcription du provirus à partir de sa région promotrice située sur le LTR en 5' se déroule en deux étapes. La première est réalisée par l'ARN polymérase II cellulaire dont le recrutement est favorisé par la fixation sur le promoteur viral de facteurs cellulaires dont NF- κ B (nuclear factor kappa B), NFAT (nuclear factor of activated T cells) et de TBP (TATA box

binding proteins). NF- κ B est un élément important de la régulation transcriptionnelle du VIH-1, en participant notamment au recrutement initial du complexe P-TEFb jouant un rôle dans l'élongation de la transcription [47]. Cette première étape permet la transcription en faible quantité d'ARN messagers (ARNm) et de transcrits multi épissés dont la traduction induit la production des protéines régulatrices Tat et Rev. La seconde étape de transcription Tat-dépendante fait intervenir les mêmes facteurs cellulaires mais elle est beaucoup plus efficace. La fixation de Tat sur le motif TAR présents sur tous les transcrits viraux permet d'augmenter la processivité de l'ARN polymérase II et de débiter la phase d'élongation de la transcription [48]. Cette seconde étape permet la production d'ARN non, mono et multi-épissés [49]. Les ARN non épissés vont d'une part constituer l'ARN génomique dimérique incorporé dans les virions et d'autre part vont permettre la traduction des précurseurs gag et gag-pol. Les ARN mono épissés (environ 5 kb) permettent la production des protéines Vif, Vpr, Vpu et du polypeptide env gp160. Enfin les ARN multi épissés (environ 2 kb) induisent la synthèse des protéines Tat, Rev et Nef [50] (figure 3A).

Le gène *gag* permet la production du précurseur polypeptidique Gag Pr55^{gag} incorporé dans les virions lors du bourgeonnement à la matrice. Il sera alors clivé par l'enzyme virale PR pour donner les protéines de structure indispensables à la maturation de la particule virale [51]. Lors de la traduction de l'ARN génomique, un décalage du cadre de lecture d'un nucléotide en arrière permet la production du précurseur Pr160^{gag-pol}. Ce phénomène de recul du ribosome apparait avec une fréquence de un événement sur vingt de traduction [52]. Les précurseurs Pr160^{gag-pol} sont également incorporés dans la particule virale immature et leur clivage par la protéase virale PR permettra par la suite la production des enzymes virales. Enfin après trimérisation du précurseur env gp160, celui-ci est clivé par la machinerie cellulaire de l'hôte afin que les glycoprotéines matures gp120 et gp41 puissent être acheminées à la membrane plasmique pour former les spicules des virions en cours de synthèse. L'ensemble de ces événements de modifications post-traductions par clivage protéolytique sont représentés dans la figure 3B.

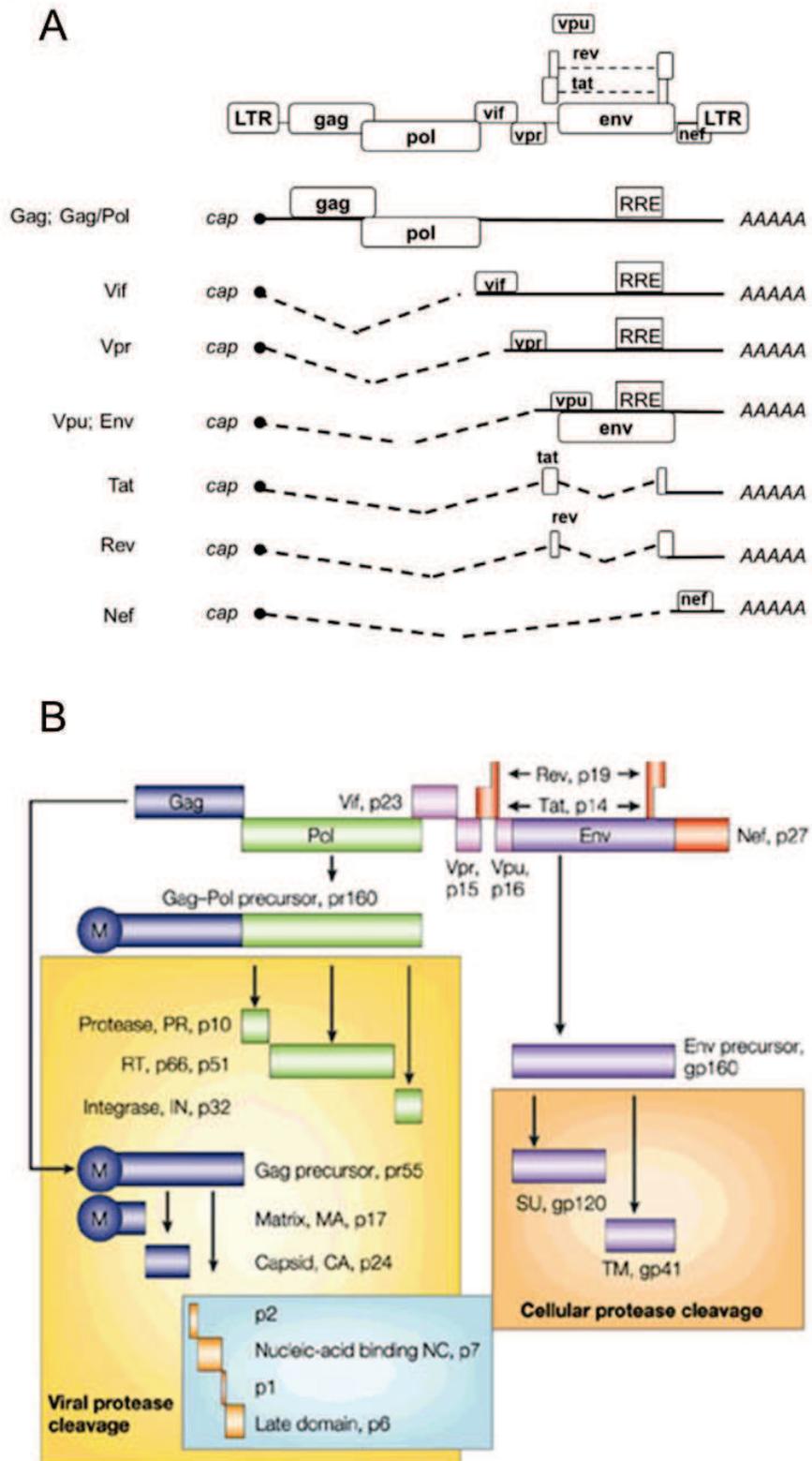


Figure 3 : Génome, transcrits et protéines du VIH-1.

(A) Production des différents ARN non, mono et multi épissés à partir du provirus VIH-1 [53]. (B) Clivages protéolytiques et synthèse de protéines virales [54].

B - Le cycle de réplication du VIH-1

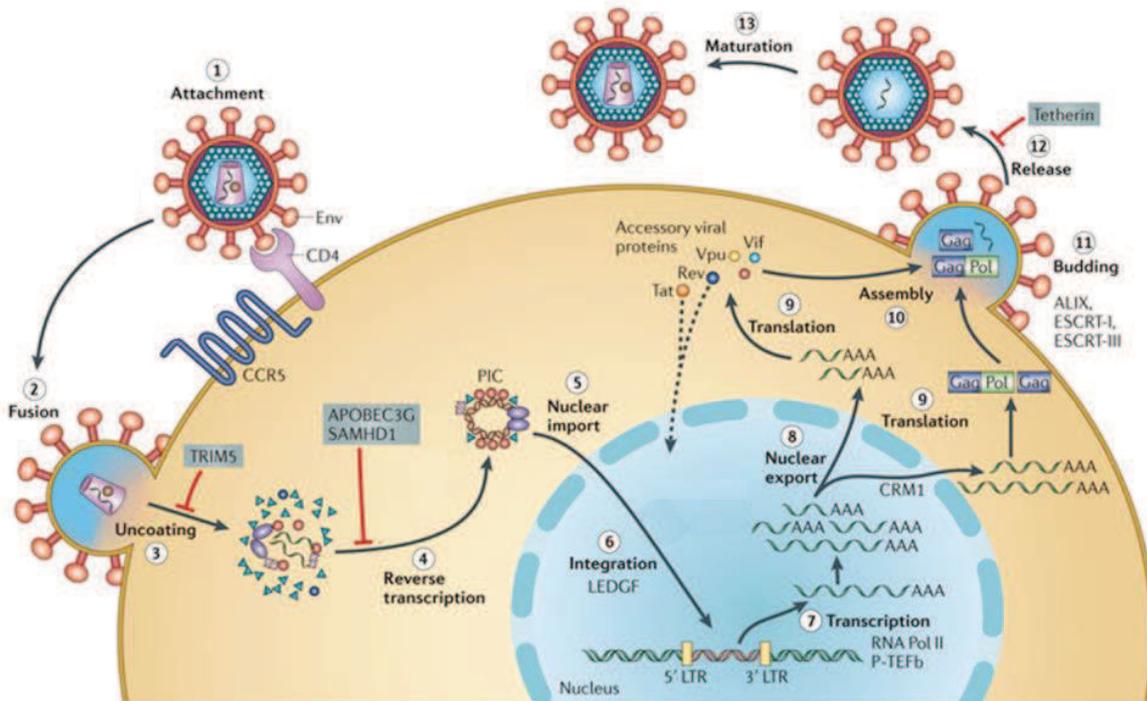


Figure 4 : Le cycle de réplication du VIH-1.

Modifiée à partir de [55].

Le cycle de réplication du VIH-1 se compose de plusieurs événements répertoriés en deux grandes parties : les étapes dites précoces englobent les phases allant de la reconnaissance de la cellule cible jusqu'à l'intégration de l'ADN viral rétrotranscrit dans le génome de l'hôte. Suivent les étapes dites tardives correspondant aux mécanismes permettant la libération de nouvelles particules virales dans le milieu extracellulaire (figure 4).

1. Les étapes précoces

a) *L'attachement et l'entrée du virus dans la cellule hôte*

La réplication du VIH-1 débute par la reconnaissance et la fixation de la particule virale à la membrane plasmique de la cellule hôte, suivie de la fusion des membranes virale et cellulaire permettant la libération de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule cible (figure 5A).

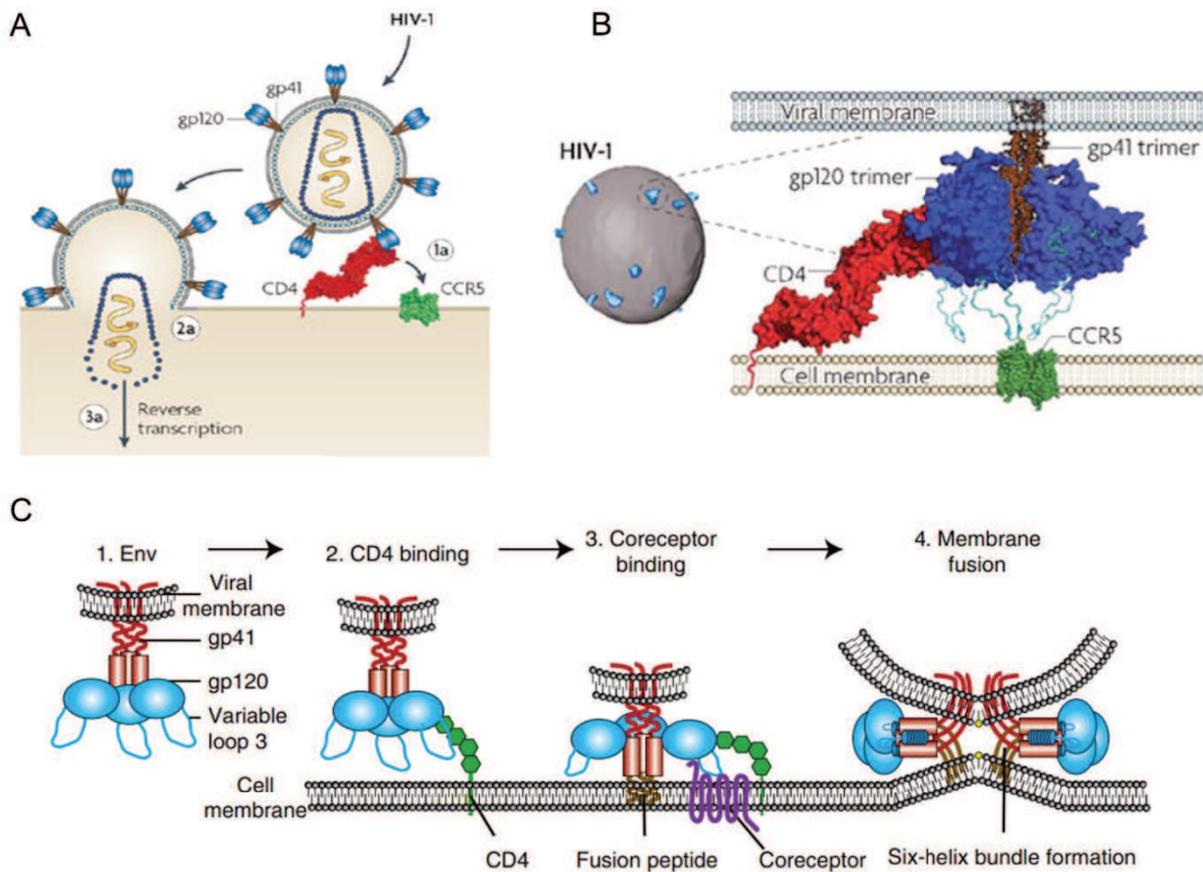


Figure 5 : Reconnaissance et entrée de la particule virale VIH-1 dans la cellule cible.

(A) Etapes de reconnaissance et d'entrée de la capside virale dans la cellule hôte. (B) Interaction entre la protéine virale gp120 et le récepteur CD4 de la cellule cible [56]. (C) Les différents mécanismes impliqués dans la fusion de la particule virale [57].

La molécule CD4, exprimée principalement à la surface des lymphocytes T CD4 et des cellules de la lignée myéloïde (monocytes et macrophages), a été mise en évidence comme un récepteur de surface pour le VIH-1 [58,59].

Comme décrit précédemment, les spicules viraux sont constitués de sous unités trimériques gp120 et gp41. La glycoprotéine gp120 est à l'origine de l'attachement à la cellule cible. Elle possède cinq domaines conservés (C1 à C5) ainsi que cinq boucles variables (V1 à V5) capables de former des ponts disulfures [57].

L'interaction entre CD4 et gp120 entraîne la formation d'un pont (bridging-sheet) entre les domaines externe et interne de la gp120 conduisant à un changement de conformation des boucles V1/V2 suivie de la boucle V3 [11]. Ce repositionnement de la boucle V3 est nécessaire à l'étape suivante d'interaction avec le corécepteur.

Les molécules CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) et CCR5 (C-C chemokine receptor type 5) ont été identifiées comme des corécepteurs de l'infection par le VIH-1 [60,61]. Les virus utilisant le corécepteur CXCR4 sont nommés X4, ceux utilisant CCR5 nommés R5 et les virus capables d'utiliser les deux types de corécepteurs R5X4 [62]. L'accessibilité de la boucle V3, induite par l'interaction avec la protéine CD4, permet à la glycoprotéine gp120 d'interagir avec son corécepteur via un domaine conservé de cette boucle V3 [12] (figure 5B).

Cette seconde interaction va induire un changement conformationnel permettant à la glycoprotéine transmembranaire gp41 d'exposer un domaine hydrophobe en N-term, nommé peptide de fusion, capable de s'insérer dans la membrane cellulaire de l'hôte [63]. Le rapprochement entre les membranes virale et cellulaire permet la formation d'une structure à six hélices regroupant des domaines charnières HR-N (amino-terminal helical region) et HR-C (carboxy-terminal helical region). Ces domaines sont donc ancrés dans chacune des membranes de part et d'autre du trimère de gp41 (figure 5C). La formation de cette structure reliant des membranes opposées sert de force motrice pour induire la création d'un pore de fusion [64].

Cette dernière étape est encore soumise à controverse. Plutôt qu'une fusion directe à la membrane plasmique, certaines équipes ont fait l'hypothèse que la particule virale pourrait être préalablement internalisée par endocytose [65]. Ces mécanismes pourraient varier en fonction du type cellulaire infecté.

b) La décapsidation et la transcription inverse

L'ordre dans lequel se déroule la décapsidation et la transcription inverse du génome viral n'est pas encore défini. L'étiollement du core viral, nommé décapsidation, pourrait se faire rapidement après l'entrée [66] ou par dissociation progressive des protéines de capsid (CA) pour se finaliser au niveau des pores nucléaires [67].

Il a été mis en évidence que l'empaquetage du RTC (reverse transcription complex) à l'intérieur d'un pseudo core, formé des protéines virales de CA, semble augmenter l'efficacité de transcription inverse et de formation du PIC (pre integration complex) [68]. Plusieurs études suggèrent également que le RTC et les protéines CA restent associés lors de la translocation via les filaments d'actine des microtubules jusqu'au pore nucléaire [69].

La transcription inverse est une étape clé du cycle répliatif des rétrovirus consistant à la transformation d'un ARN simple brin de polarité positive en ADN double brin. Celle-ci se déroule dans le RTC (reverse transcription complex) en étant catalysée par l'enzyme virale RT possédant plusieurs sites actifs. La RT possède des domaines en N-term ayant une activité ADN polymérase ARN ou ADN dépendante et un domaine en C-term avec une activité RNase H [55].

Lors de la maturation des particules virales VIH-1, l'amorce cellulaire ARNt^{lys3} est encapsidée dans le virion et se lie à la séquence PBS (primer binding site) présente en 5' de l'ARN simple brin [70]. L'initiation de la transcription inverse se traduit par l'élongation de cet ARNt et la synthèse de l'ADN des régions U5 et R.

L'activité nucléase de la RNase H permet la digestion de l'ARN contenu dans l'hybride ARN/ADN ainsi formé et la libération d'une partie du brin d'ADN (-) dont la séquence est pour l'instant uniquement complémentaire des régions U5 et R en 5' du génome viral.

La présence de séquences répétées R permet la fixation de ce brin d'ADN (-) en cours de synthèse en 3' de l'ARN viral matrice. Cette étape est nommée premier saut de brin [71].

L'élongation du brin d'ADN (-) est ainsi réalisée par le biais de l'activité ADN polymérase ARN dépendante de la RT et permet la synthèse d'un nouvel hybride double brin ARN/ADN jusqu'à la séquence PBS de l'ARN tronqué. L'ARN de cet hybride sera une nouvelle fois dégradé par son activité RNase H à l'exception des deux régions riches en purines cPPT et 3'PPT (poly purine tracts).

L'activité ADN polymérase ADN dépendante de la RT permet ensuite la synthèse du brin d'ADN (+) à partir des séquences ARN cPPT et 3'PPT, servant alors d'amorce, et de la matrice ADN (-).

Les dernières séquences d'ARN sont dégradées par l'activité RNase H de la RT et un second saut de brin permet l'appariement des séquences PBS sur les deux brins d'ADN.

Pour finir une polymérisation bidirectionnelle permet la formation d'un ADN double brin entouré de part et d'autre de séquences LTR (Long terminal repeat). La présence du cPPT lors de synthèse du brin d'ADN (+) provoque la formation d'une discontinuité résultant en une structure particulière composée d'un triple brin d'ADN au centre de la séquence nommée ADN Flap. Ce motif joue notamment un rôle lors de l'import nucléaire de l'ADN viral flanqué double brin [68].

L'ensemble de ces étapes sont détaillées dans la figure 6.

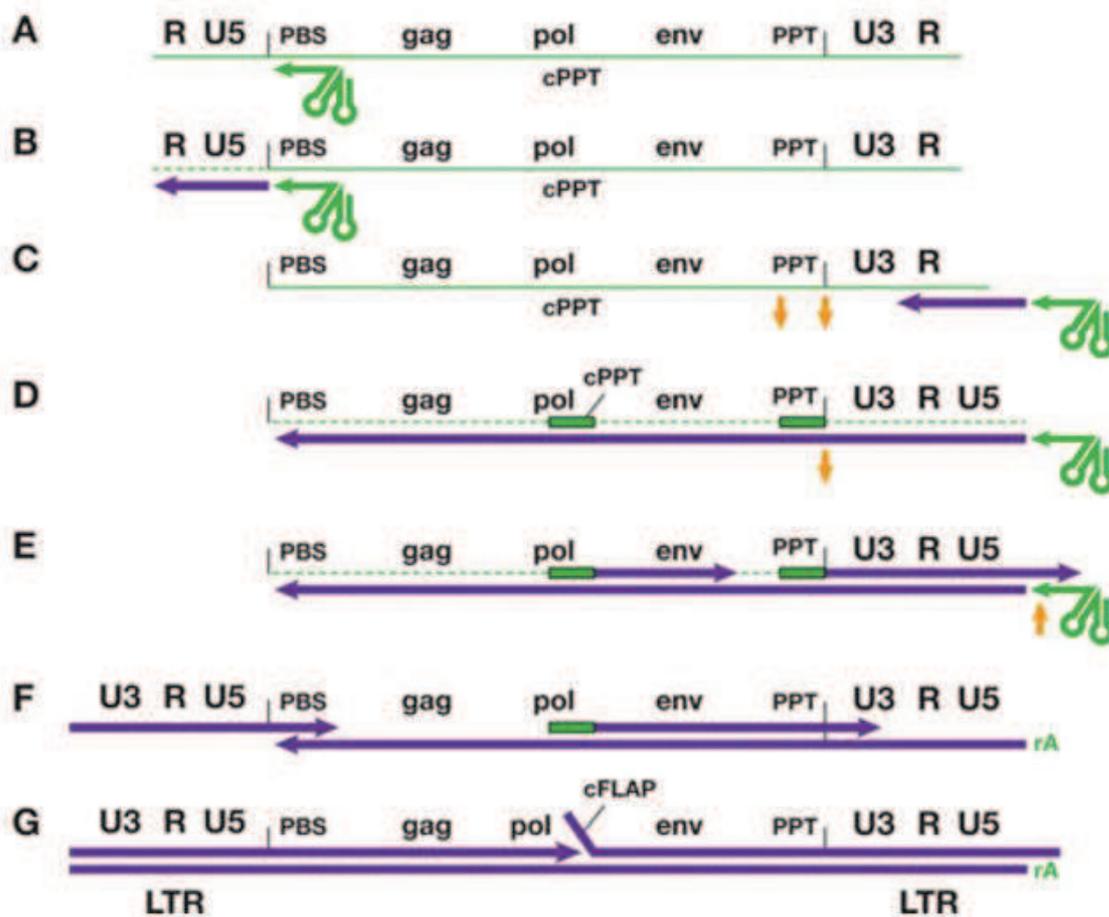


Figure 6 : Différentes étapes de la transcription inverse du VIH-1.

(A) Hybridation de l'ARNt (représenté par une flèche verte) sur la séquence PBS (primer binding site) de l'ARN viral. (B) Initiation de la synthèse du brin d'ADN (-) et (C) premier saut de brin permettant (D) l'élongation de la synthèse du brin négatif sur toute la longueur du génome. (E) Synthèse du brin d'ADN (+) à partir des séquences PPT (poly purine tract) conservées de l'ARNv comme amorces et du brin ADN (-) comme matrice. (F) Un second saut de brin permet l'appariement des séquences PBS sur les deux brins et permet de finaliser la synthèse d'ADN viral double brin. Le produit final est plus long que l'ARN viral matrice car les séquences des extrémités R-U5 en 5' et U3-R en 3' ont été partiellement dupliquées et ont permis de générer les LTR (Long terminal repeat) U3-R-U5. Dans cette figure les séquences ARN sont représentées en vert dont celles en cours de dégradation par l'activité RNase H de la RT sont indiquées en pointillées. Les séquences ADN sont quant à elles indiquées en violet [72].

c) *L'import nucléaire et l'intégration*

Le RTC subit des modifications pour aboutir en un second complexe le PIC (pre integration complex). Le PIC est une structure multiprotéique dont la taille est estimée à une cinquantaine de nanomètres qui a pour rôle de protéger l'ADN viral de la dégradation et de favoriser son intégration dans le génome de l'hôte.

Dans des cellules en division, l'intégrité de la membrane nucléaire étant altérée cela pourrait rendre l'ADN génomique facilement accessible au PIC. Pourtant plusieurs études ont montré que l'import du PIC dans le noyau des cellules en division nécessite l'action de protéines impliquées dans les pores nucléaires. De plus, le passage en phase de mitose n'est pas requis pour une infection VIH-1 effective [73]. En effet le VIH-1 possède également la capacité d'infecter des cellules qui ne se divisent pas, dites quiescentes, telles que les macrophages. Le PIC étant un complexe volumineux, il ne peut pas utiliser un transfert passif par diffusion pour atteindre le noyau. Il a donc été confirmé que l'import nucléaire du PIC nécessite les pores nucléaires actifs [74].

Dans un contexte biologique, le transport intranucléaire est médié par des pores nucléaires transmembranaires formés de nucléoporines impliquant d'autres composants cellulaires comme les importines et des transporteurs.

Le mécanisme actif de translocation du PIC n'est pas encore caractérisé. Il a été suggéré que la plupart des protéines constituant le PIC possèdent un motif NLS (nuclear localization signal). Les importines α et β sont impliquées respectivement dans l'interaction avec ce signal NLS et dans l'association de ce complexe aux nucléoporines. Cependant la nature de ces signaux NLS, les protéines virales ainsi que les facteurs cellulaires impliqués dans l'import nucléaire du PIC sont encore soumis à controverse [75].

Le PIC est constitué de plusieurs protéines à la fois d'origine cellulaire et virale semblant jouer un rôle dans le processus de translocation de l'ADN viral dans le noyau. L'interaction des protéines Vpr et CA avec des nucléoporines pourrait favoriser la décapsulation de la particule aux abords du pore nucléaire afin de permettre l'acheminement du PIC vers le noyau [76,77]. Il a aussi été démontré que l'IN est capable d'interagir avec les importines α , β et γ [78,79]. Les protéines virales MA et Vpr possèdent également des séquences NLS leur permettant d'interagir avec les importines α et β [80]. Cependant la déplétion simultanée de l'ensemble de ces signaux n'est pas suffisante pour empêcher le processus d'import nucléaire du PIC [81].

Un des éléments les plus controversés au sujet de son implication dans le PIC est la protéine cellulaire TNPO3 (transportin 3). L'IN est capable d'interagir avec TNPO3, cependant un rôle de cette transportine dans l'import nucléaire du PIC via l'interaction avec l'IN est actuellement débattu car les études à ce sujet divergent fortement [82,83,84]. TNPO3 interagit également avec la CA et pourrait favoriser l'import nucléaire en interférant avec la protéine CPSF6 impliquée dans le maintien de l'intégrité du core viral [85]. Enfin le motif Flap sur l'ADN viral pourrait jouer un rôle dans l'import nucléaire en favorisant la décapsulation à proximité du pore nucléaire [68] ou en permettant la mise place d'une conformation

favorisant l'exposition des NLS [86]. Mais l'importance de ce motif Flap sur l'ADN viral dans ce mécanisme est lui aussi très controversé [87].

Une fois le PIC ayant atteint le noyau, l'enzyme virale IN catalyse l'événement d'intégration de l'ADN viral dans les régions transcriptionnellement actives du génome de l'hôte. Le mécanisme et les protéines impliqués dans cette étape clé du cycle virale du VIH-1 étant au centre de mon sujet de thèse, ils seront détaillés dans la partie III de mon introduction.

2. Les étapes tardives

Les étapes dites tardives regroupent la transcription virale, l'épissage des ARN messagers, l'export des transcrits viraux vers le cytoplasme, leur traduction ainsi que la formation et la libération de nouveaux virions au niveau de la membrane plasmique.

La transcription et l'épissage des ARNs proviraux se déroulent dans le noyau de la cellule hôte comme décrit précédemment. La transcription virale est dépendante de la structure de la chromatine, de facteurs de transcription cellulaires ainsi que de la protéine virale Tat.

Selon la structure de la chromatine où se situe le provirus le devenir viral est variable. Une structure de chromatine fermée, diminuant l'accès des facteurs de transcription cellulaires sur le provirus, est associée au phénomène de latence. Au contraire une chromatine ouverte permet une transcription virale dite active [88,89].

Ces étapes permettent la synthèse d'ARNs viraux non, mono et multi épissés. Afin de permettre la libération dans le cytoplasme de l'ensemble de ces formes d'ARNv viraux, le virus utilise un mécanisme alternatif de la machinerie cellulaire d'export nucléaire impliquant la protéine régulatrice Rev comme décrit précédemment. Une partie des ARN non épissés sont traduits par la machinerie cellulaire afin de produire les précurseurs polypeptidiques gag et gag-pol. La production du précurseur env gp160 sous forme de tétramères passe par la voie endosomale puis son clivage en protéines gp120 et gp41 est réalisé par une protéase cellulaire.

Le précurseur Gag Pr55^{gag} orchestre de nombreuses interactions avec des constituants cellulaires et viraux essentielles à l'amorçage du bourgeonnement. En effet, la seule présence du précurseur Gag est suffisante pour induire la production de pseudo-particules virales [90]. Son domaine N-term codant pour la protéine MA se lie à la membrane plasmique et favorise l'incorporation des protéines d'enveloppe gp120 et gp41 dans les virions en cours de synthèse. En C-term, son domaine CA permet la multimérisation du

précurseur et le domaine NC interagit avec l'ARN viral non épissé génomique afin de l'acheminer à la membrane. Le précurseur gag-pol Pr160^{gag-pol} possédant l'ensemble de ces domaines est également capable de réaliser chacune de ces fonctions et se retrouve lui aussi fiché dans la membrane plasmique. Le domaine p6 du précurseur Pr55^{gag} interagit alors avec la machinerie cellulaire ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) qui catalyse la fission de la membrane et permet la libération de particules virales immatures. L'ensemble des événements conduisant au bourgeonnement et à la libération de particules virales est représenté dans la figure 7A [91]. Il est également important de noter que ce complexe de pré assemblage implique d'autres protéines virales telles que Vif et Vpr ainsi que des composants cellulaires comme APOBEC3G [92].

L'ensemble de ces processus permet la libération de particules virales immatures non infectieuses VLP (virus-like particle). Dans les VLP les précurseurs Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol} sont disposés de manière radiale contre la membrane virale. En microscopie électronique la morphologie de virions immatures est caractérisée par l'observation de cercles distendus à la périphérie de la particule (figure 7B haut). De façon concomitante avec leur relargage, les VLP subissent une dernière étape dite de maturation. La maturation protéolytique est initiée par l'autoclivage de la protéase virale dont le site actif est situé à l'interface du dimère de PR [93] présent dans les précurseurs Pr160^{gag-pol}. La PR libérée est fonctionnelle et entraîne le clivage des précurseurs Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol} de manière séquentielle afin d'aboutir à la libération des protéines de structure et des enzymes virales. Suite à ce clivage protéolytique la protéine CA s'organise en un réseau d'hexamères et de pentamères [94] afin de former le core viral ayant un rôle protecteur de l'ARN viral génomique préalablement condensé grâce aux protéines de NC [95]. Les virions VIH-1 matures présentent un core conique apparaissant dense aux électrons en microscopie électronique (figure 7B bas).

La maturation de la particule virale est essentielle à l'acquisition de son infectivité. En effet des études ont montré que l'inhibition partielle de la maturation protéique induit la formation de virions non infectieux ayant une morphologie intrinsèque différente. En microscopie électronique, ces particules virales possèdent un core non conique décrit comme aberrant et une structure dense aux électrons accolée à la membrane virale [96].

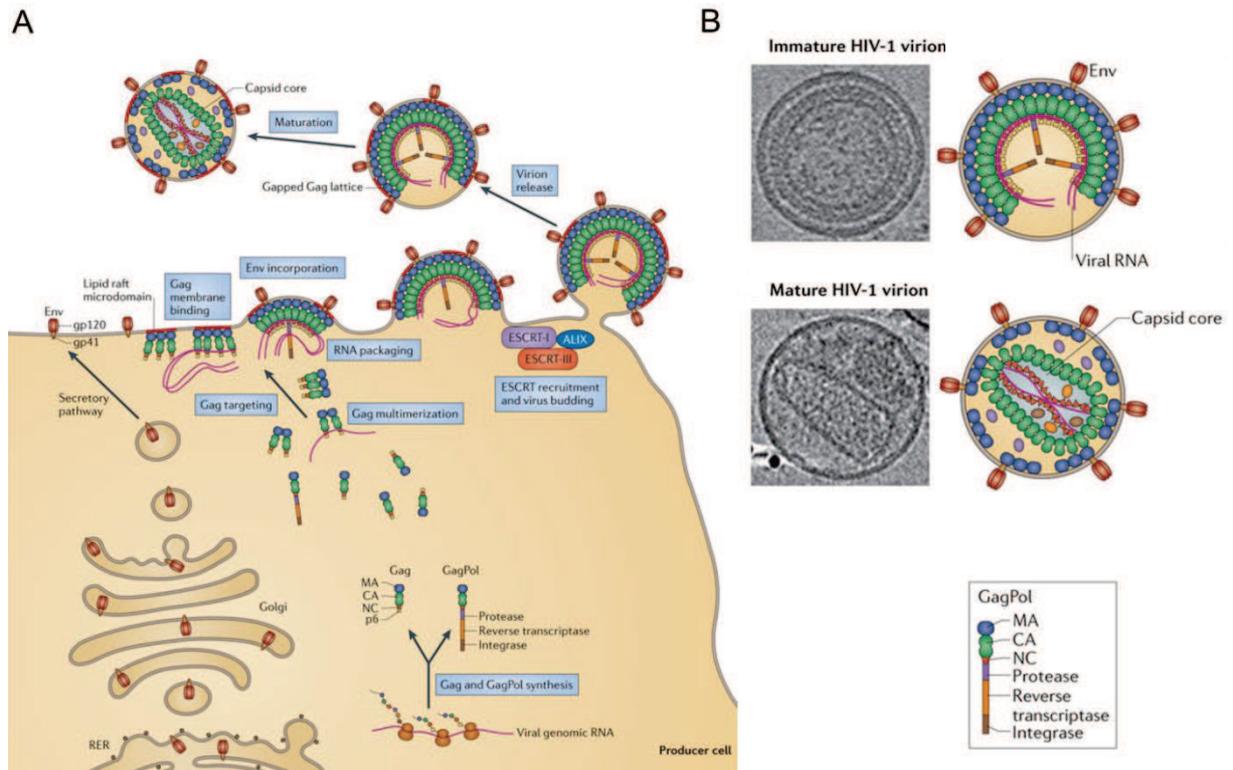


Figure 7 : Assemblage et bourgeonnement de particules virales VIH-1.

(A) Schéma des différentes étapes tardives conduisant à la libération de particules virales. Les virions produits sont immatures et le clivage par l'enzyme PR permet leur maturation dans le milieu extracellulaire, étape indispensable à l'acquisition de leur capacité d'infectivité. (B) Images en microscopie électronique et schémas de virions VIH-1 immature et mature [91].

Après avoir caractérisé les étapes constituant le cycle de réplication du VIH-1, nous pouvons désormais décrire les différentes classes d'antirétroviraux actuellement utilisées dans le traitement de la pathologie SIDA associée à l'infection par le VIH-1. En effet ces inhibiteurs ayant été synthétisés pour cibler spécifiquement différentes étapes de la réplication du VIH, nous avons choisi de décrire ces étapes en amont de la partie suivante de mon manuscrit portant sur la pandémie.

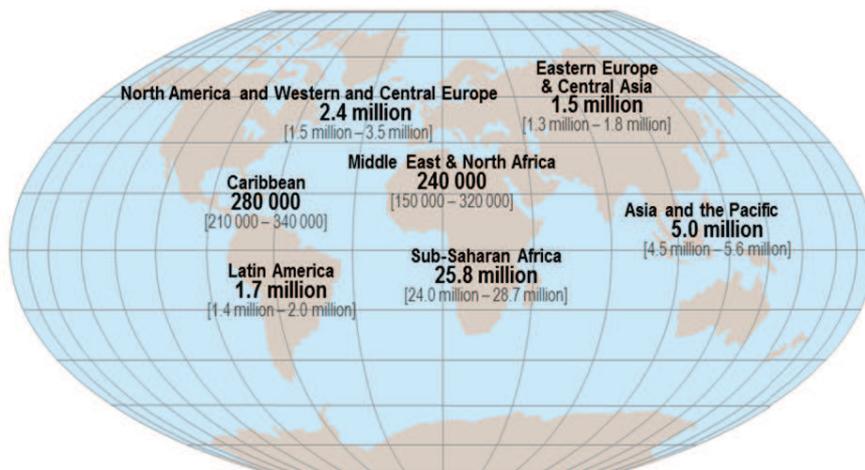
II - Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA)

A - Epidémiologie

1. Pandémie

Depuis le début de l'épidémie dans les années 80, 78 millions de personnes ont été infectées par le VIH partout dans le monde dont 35 millions sont décédées des suites de maladies opportunistes associées au SIDA. La pandémie du SIDA est encore à ce jour un problème de santé majeur car il s'agit d'une des principales causes de mortalité à l'échelle mondiale.

A



B

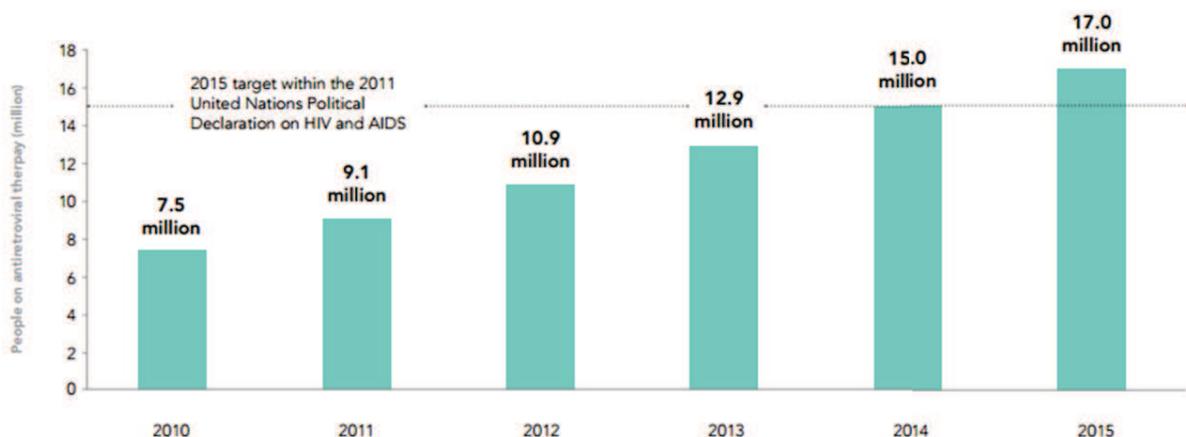


Figure 8 : Pandémie mondiale de l'infection au VIH.

(A) Répartition du nombre de personnes (adultes et enfants) vivant avec le VIH en 2014. (B) Nombre de personnes ayant reçu un traitement antirétroviral depuis 2010. Données UNAIDS.

Selon le rapport de l'UNAIDS 2016 (United Nations Programme on HIV/AIDS) le nombre de personnes vivant avec le VIH était de 36,7 millions en 2015 dont plus de 2 millions de personnes nouvellement infectées. Le SIDA est encore aujourd'hui la première cause de décès en Afrique Subsaharienne avec plus de 25 millions de personnes vivant avec le VIH en 2014 (figure 8A).

Malgré l'avancé dans le développement et dans l'accessibilité aux traitements antirétroviraux, en 2015 uniquement 17 millions de personnes étaient sous trithérapie (figure 8B). Cela représente seulement 46% de la population mondiale infectée par le VIH. Des progrès majeurs ont été observés ces dernières années par la diminution considérable du nombre de décès liés au SIDA ainsi que du nombre de transmissions mère-enfant. Cependant l'accès aux traitements antirétroviraux n'est pas encore suffisant, notamment en Afrique subsaharienne où plus de 10 millions de personnes infectées n'ont pas encore accès à la trithérapie.

Avec l'émergence de résistances aux antirétroviraux actuellement utilisés en trithérapie et dans l'espoir de réellement diminuer l'épidémie mondiale. La recherche biomédicale reste encore à ce jour essentielle pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment d'un point de vue préventif.

2. Physiopathologie en absence de traitement

L'infection par le VIH-1 peut se diviser en trois phases distinctes en fonction de la charge virale dans le sang et du nombre de lymphocytes T CD4 (LT CD4) circulants chez les patients infectés au cours du temps. D'autres facteurs sont également évalués lors du suivi de l'infection comme le taux de lymphocytes T CD8 ainsi que la production d'anticorps reconnaissant des épitopes du VIH-1 (figure 9).

La première phase dite de primo infection est caractérisée par l'augmentation drastique et rapide de la charge virale plasmatique associée à une diminution transitoire du nombre de LT CD4 durant les premières semaines suivant l'infection. Il s'agit d'une période où le virus se réplique très efficacement et infecte les LT CD4, cible privilégiée du VIH-1. C'est également au cours de cette phase que le virus se propage dans les organes lymphoïdes et les réservoirs viraux [97].

Les individus nouvellement infectés par le VIH-1 présentent des symptômes associés à un syndrome pseudo-grippal tels que de la fièvre, des inflammations des amygdales et des éruptions cutanées [98]. L'infection active induit la mise en place d'une réponse immunitaire

adaptative spécifique associée à la production dans le sang de lymphocytes cytotoxiques (LT CD8) ainsi que d'anticorps reconnaissant des épitopes du VIH-1. Cette stimulation immunitaire est corrélée à une forte diminution de la charge virale plasmatique et à une ré-augmentation du nombre de LT CD4 circulants.

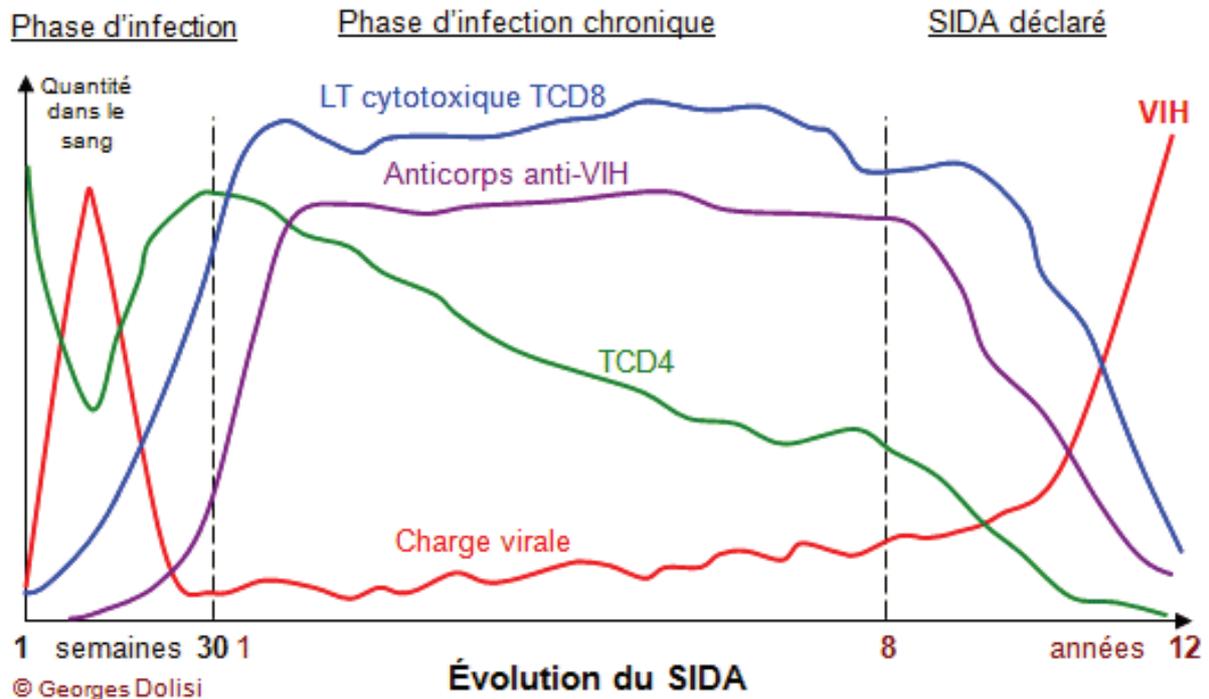


Figure 9 : les différentes phases cliniques de l'infection par le VIH-1.

La seconde phase dans l'évolution de l'infection au VIH-1 est la plus longue, il s'agit d'une phase asymptomatique d'infection chronique. Elle peut varier de quelques mois à plusieurs dizaines d'années en fonction des individus. Lors de cette période l'infection virale et le système immunitaire sont en quelque sorte à l'équilibre. La réponse immunitaire spécifique permet de maintenir la charge virale à un niveau faible en renouvelant la production constante de LT CD4 ce qui compense le déficit créé par la mort des LT infectés. Malgré le fait que cette phase soit asymptomatique, le virus est capable de se répliquer et la transmission virale est possible.

Même si la charge virale plasmatique est stabilisée lors de l'infection chronique, le VIH-1 continue de se répliquer dans les organes lymphoïdes et épuise le système immunitaire de l'hôte ce qui conduit à un déclin progressif du nombre de LT CD4 circulants. Cela mène à la dernière phase de l'infection au VIH-1, lorsque le nombre de LT CD4 circulants passe en dessous du seuil de 200 cellules/ml de sang, le stade SIDA est déclaré.

La phase SIDA déclarée est donc caractérisée par un déclin du système immunitaire dans son ensemble, à la diminution drastique du nombre de LT CD4 mais également de LT CD8 et d'anticorps anti-VIH. Cela entraîne une augmentation exponentielle et rapide de la virémie. Les patients au stade SIDA étant immunodéficients, leur organisme n'est plus en mesure de se défendre contre l'invasion de divers pathogènes et meurent généralement des suites de maladies opportunistes.

3. Les thérapies ART

a) *Historique et évolution des traitements anti VIH*

L'émergence des premiers cas de SIDA avérés correspond à l'apparition de la biologie moléculaire moderne qui permet, par le biais de nouvelles approches mécanistiques, d'accélérer le développement de composés antirétroviraux. Ainsi quatre ans après la découverte du VIH comme agent pathogène du SIDA, la première molécule ayant une activité antirétrovirale est approuvée par la FDA (food and drugs administration). L'AZT (Zidovudine) est un inhibiteur de l'étape de reverse transcription médiée par l'enzyme virale RT [99,100]. A partir de 1987, les patients infectés par le VIH-1 sont donc traités par monothérapie d'AZT. Durant le début des années 90 d'autres antirétroviraux sont également approuvés par la FDA comme la didanosine (Videx) ou la stavudine (Zerit). L'ensemble de ces molécules font partie de la classe des NRTIs (nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors). Cependant l'utilisation à long terme de monothérapies se révèle inefficace et démontre la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques [101].

Les traitements combinant deux antirétroviraux sont utilisés à partir de 1992 et remplace la monothérapie deux ans plus tard. A partir de 1995 de nouvelles classes d'antirétroviraux font leur apparition sur le marché biopharmaceutique. Tel que l'inhibiteur de protéase saquinavir (Fortovase/Invirase), synthétisé suite à la caractérisation structurelle de l'enzyme virale PR par cristallographie, et la nevirapine (Viramune) première molécule de la classe des NNRTIs (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors). Les thérapies utilisant ces nouvelles classes de composés permettent une diminution exponentielle de la virémie chez les patients infectés [102,103].

L'ère moderne de la trithérapie antirétrovirale débute en 1997 via l'utilisation d'un traitement combinant deux NRTIs avec un inhibiteur de protéase ou un NNRTI. Ce traitement permet la diminution de la mortalité associée à l'infection ainsi que de la charge virale en dessous du

seuil cliniquement détectable [104]. La thérapie basée sur la triple combinaison d'antirétroviraux est depuis nommée HAART (Highly active antiretroviral therapy).

La gamme d'antirétroviraux a continué à se développer en ciblant d'autres étapes de la réplication du VIH-1. Ainsi deux nouvelles classes ciblant l'entrée du virus furent acceptées par la FDA, avec en 2003 l'enfuvirtide /T-20 un inhibiteur de fusion [105], puis en 2007 le Maraviroc un antagoniste du corécepteur CCR5.

Enfin des molécules ciblant la dernière enzyme virale IN furent développées. Le Raltégravir fut le premier de la classe des INSTIs (intégrase strand transfert inhibitors) à être accepté par la FDA en 2007 [106]. Suivirent à partir de 2013, le Dolutégravir et l'Elvitegravir faisant partie de la même classe d'inhibiteur d'IN [107].

Malgré le fait qu'il existe aujourd'hui des traitements antirétroviraux (ART) très efficaces, des résistances contre l'ensemble des classes d'antirétroviraux actuellement sur le marché ont été mises en évidence chez les patients traités. La recherche de nouveaux agents thérapeutiques est toujours prioritaire.

Depuis 2010 de nouveaux inhibiteurs de l'IN avec un mécanisme d'action innovant sont en développement dans différentes entreprises biopharmaceutiques. Ces molécules font partie d'une nouvelle classe d'antirétroviraux comme inhibiteurs de l'interaction entre l'intégrase virale et son principal cofacteur cellulaire la protéine LEDGF/p75.

b) Déclin de la virémie sous thérapie ART

Depuis 2010 aux Etats-Unis et en Europe, la thérapie ART est initiée chez les patients ayant un nombre de LT CD4 inférieur à 350 cellules/mm³ et une virémie entre 10⁵-10⁴ copies d'ARN viral/ml de sang. La physiopathologie de l'infection VIH-1 est alors caractérisée par un déclin multiphasique de la charge virale plasmatique (figure 10).

La première phase du déclin de la virémie apparaît rapidement suite à la prise du traitement. Elle est associée à l'élimination des LT CD4 infectées. En effet les LT CD4 actives sont les cibles préférentielles du VIH-1. Ces cellules sont très sensibles aux effets cytopathiques liés à l'infection et ont un temps de demi-vie court (1 jour). Ainsi la thérapie ART permettant l'inhibition drastique de la réplication virale, les LT CD4 préalablement infectées meurent et le renouvellement naturel induit par le système immunitaire permet de restaurer un « pool » de cellules LT CD4 actives non infectées.

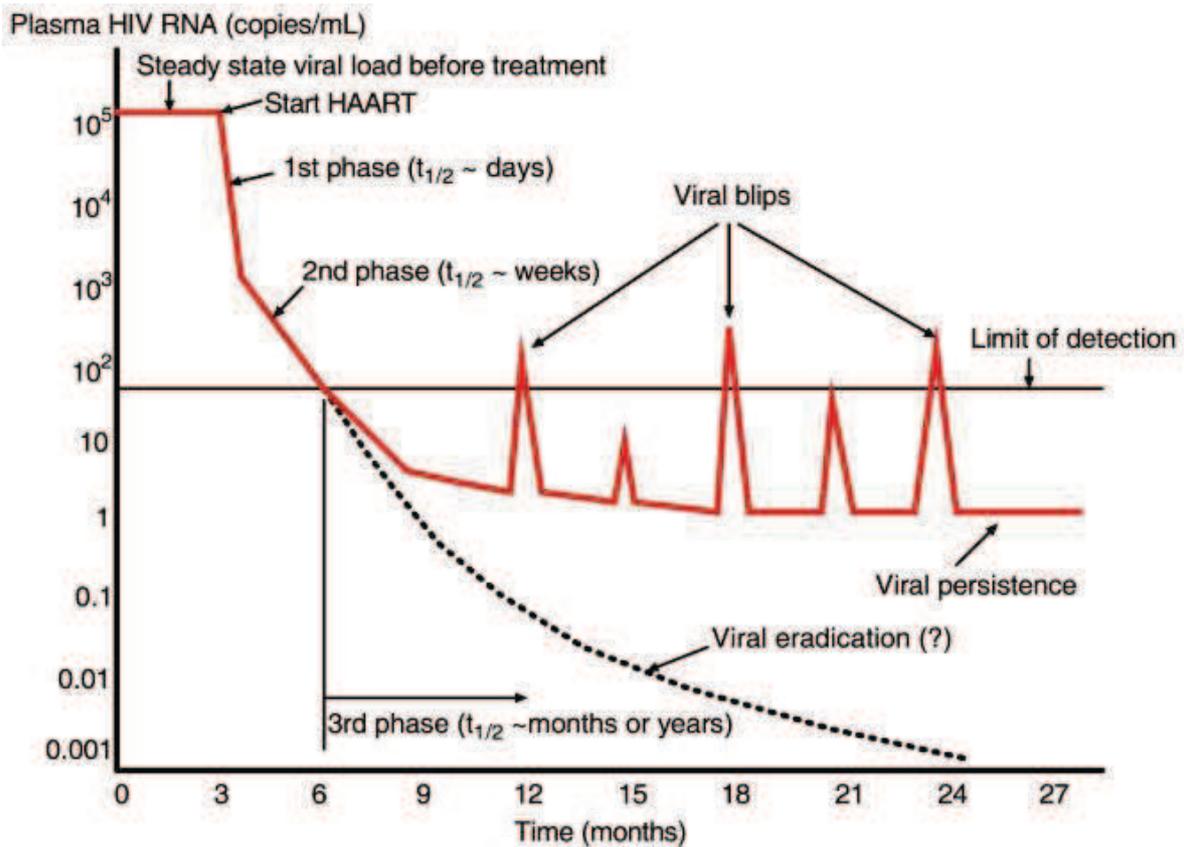


Figure 10 : Déclin de la virémie sous traitement ART [108].

La seconde phase est plus lente mais permet d'atteindre un seuil de charge virale dans le sang cliniquement non détectable (< 20-50 copies d'ARN viral/ml de sang). La diminution de la virémie dans cette seconde phase correspond à l'élimination de cellules de la lignée myéloïde macrophages et cellules dendritiques. Cette phase est plus progressive que la précédente car ces cellules sont moins sensibles à la cytotoxicité induite par le VIH-1 et ont une demi-vie plus longue (plusieurs semaines).

Au regard de l'efficacité des traitements ART résultant en une reconstitution significative du système immunitaire, des études portant sur la demi-vie des cellules infectées avaient prédit l'éradication du VIH-1 après plusieurs années de trithérapies [109]. Malheureusement même après de nombreuses années sous thérapie, dès deux semaines après l'arrêt du traitement l'ARN viral redevient détectable dans le sang des patients [110].

En effet même si la charge virale n'est plus détectable, la réplication du VIH-1 n'est pas complètement supprimée par le traitement. Une des évidences de cette persistance est l'observation de rebonds de virémie chez les patients sous ART [111]. La durée, l'amplitude et l'origine de ces épisodes transitoires de pics de la charge virale ne sont pas encore bien

caractérisés [112,113,114]. Cependant les rebonds de virémie sous traitement ART démontrent l'existence de réservoirs viraux empêchant l'éradication du VIH-1.

Le VIH-1 cause une infection chronique pour laquelle aucun traitement curatif n'est disponible pour le moment. Les patients infectés suivent un traitement ART à vie et la tolérance aux antirétroviraux, les interactions médicamenteuses et l'accessibilité aux traitements peuvent compromettre l'efficacité de la thérapie.

c) *La thérapie préventive*

La transmission dite verticale correspond à la transmission du virus de la mère à l'enfant au cours de la grossesse, de l'accouchement ou de l'allaitement. Depuis le début de la pandémie ce phénomène est au cœur de la recherche de thérapies antirétrovirales préventives. En 1994, il a été démontré que le traitement des femmes enceintes infectées avec de l'AZT permettait de prévenir la transmission verticale du VIH-1 [115].

La transmission verticale étant liée à la charge virale plasmatique, lorsque les femmes enceintes sont traitées par des thérapies ART le risque de transmission périnatale est inférieur à 2 % [116]. Selon le rapport annuel de l'UNAIDS l'utilisation de thérapies ART adaptées pour la mère et le fœtus, a permis de diminuer de près de 70% les cas de transmission mère enfant l'an dernier.

En 2011, l'utilisation des thérapies ART chez des couples dits serodiscordants, c'est-à-dire avec seulement l'un des deux partenaires infecté, a montré une efficacité de prévention de l'infection chez les personnes saines [117].

Jusqu'à très récemment aucun antirétroviral n'avait encore été caractérisé comme préventif, c'est désormais chose faite. En effet le tenofovir disoproxil fumarate (Truvada) produit par Gilead, faisant partie de la classe des NRTIs, vient d'être accepté par la commission européenne comme premier traitement antirétroviral préventif ciblant exclusivement des personnes à haut risque de contamination. Cela fait suite aux études ayant démontré l'efficacité du Truvada dans des tests de prophylaxies en préexposition au VIH-1 [118].

B - Les différentes classes actuelles d'antirétroviraux

Les traitements actuels ART sont constitués de la combinaison de plusieurs antirétroviraux ciblant différentes étapes clés du cycle de la réplication du VIH-1. A ce jour, six classes d'antirétroviraux ont été approuvées par la FDA (figure 11) et d'autres sont en cours d'essais cliniques. Depuis quelques mois des médicaments combinant directement plusieurs classes d'inhibiteurs ont également été mises sur le marché biopharmaceutique.

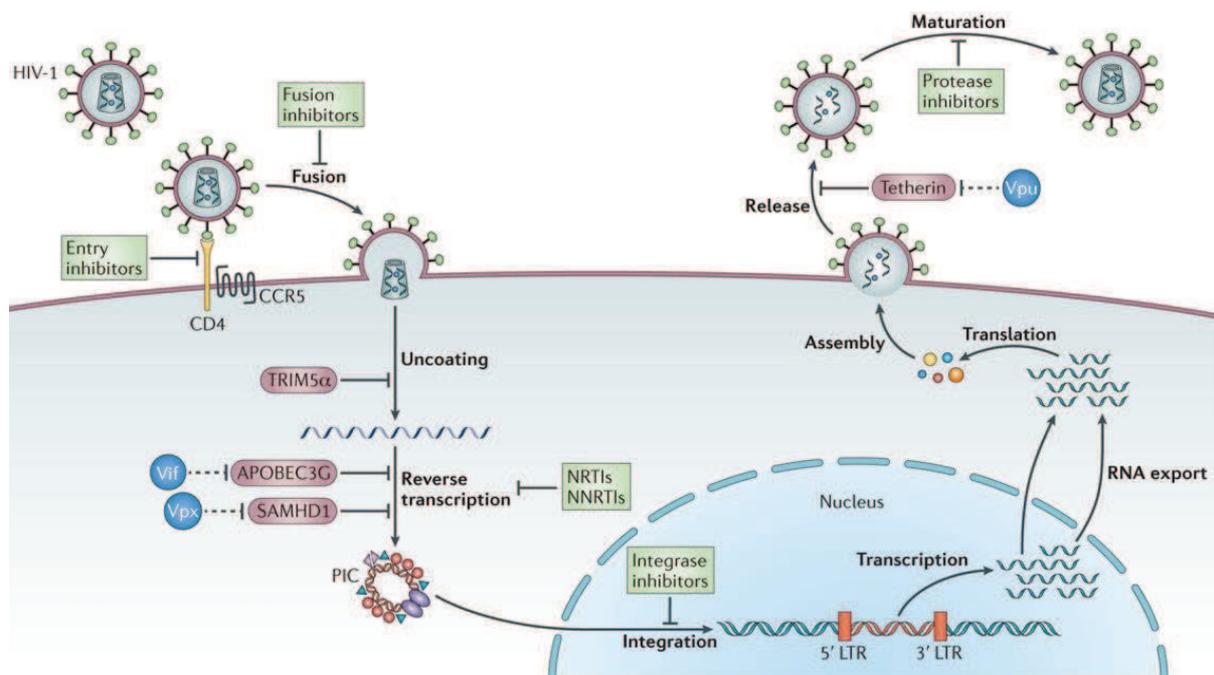


Figure 11 : Les étapes du cycle de réplication du VIH-1 ciblées par les différentes classes d'antirétroviraux.

Les classes d'antirétroviraux actuellement acceptées par la FDA sont référencées en vert, les facteurs de restriction cellulaires en rose et les protéines virales contrecarrant leur activité en bleu [119].

1. Les inhibiteurs d'entrée

L'entrée virale, la première étape du cycle répliatif du VIH-1, est la cible de plusieurs classes d'antirétroviraux dont seulement deux ont été acceptées par la FDA à ce jour : les antagonistes du corécepteur et les inhibiteurs de fusion membranaire.

Les molécules antagonistes du corécepteur viral CCR5 sont parmi les composés les plus récents développés. Il s'agit de petites molécules capables de se fixer dans une poche

hydrophobe de la région transmembranaire en hélices du CCR5 [120]. Son site de fixation diffère de la partie extracellulaire de la protéine engagée dans l'interaction avec la protéine d'enveloppe virale gp120. Cependant la fixation de cette molécule induit un changement conformationnel du corécepteur empêchant sa reconnaissance par la boucle V3 de la gp120. Ces molécules sont donc considérées comme les premiers inhibiteurs allostériques [121]. L'activité antirétroviral de ces molécules a été reconnue car leur utilisation inhibe efficacement la réplication du VIH-1 chez l'Homme [122] et l'utilisation du composé Maraviroc (MVC) fut approuvé dans le traitement thérapeutique. La cible de ces inhibiteurs étant cellulaire, une résistance inférieure à ce qui est observé pour les autres classes d'antirétroviraux était espérée. Cependant l'utilisation de MVC lors du traitement de patients infectés induit la mise en place de mécanismes de résistance encore mal compris à ce jour. Sachant que la disposition et la reconnaissance des corécepteurs CXCR4 ou CCR5 à la surface des lymphocytes et des monocytes/macrophages sont les déterminants majeurs du tropisme viral, il a été proposé que la résistance à ce traitement soit associée à un changement du tropisme viral en CXCR4. Néanmoins des études ont suggéré que ce changement avait lieu uniquement lorsque le virus possède déjà un tropisme X4 avant l'initiation du traitement MVC [123]. Une autre cause de résistance pourrait être l'augmentation de l'affinité du virus pour le corécepteur CCR5. La susceptibilité aux antagonistes CCR5 semble variée en fonction du type cellulaire, de l'état d'activation des cellules infectées ainsi que du nombre de cycles réplicatifs du virus [121]. De plus la détection de résistance au MVC par les tests utilisés actuellement est difficile, ce qui rend l'utilisation d'antagonistes du CCR5 plus compliquée que d'autres classes d'antirétroviraux.

La seconde classe ciblant l'entrée virale sont des inhibiteurs de fusion. Ce sont des peptides avec une conformation en hélice alpha homologues du domaine N-term de la protéine d'enveloppe gp41. La fixation de la molécule empêche la conformation fonctionnelle en une structure à six hélices de la gp41 et inhibe ainsi le processus de fusion des membranes cellulaire et virale. L'enfuvirtide (T-20) dont l'efficacité d'inhibition de la réplication du VIH-1 a été démontrée [124], est la seule molécule de cette classe d'antirétroviraux utilisée actuellement. La plupart des mutations de résistance au T-20 sont localisées dans la région N-term de la gp41, à laquelle se fixe la molécule. Ces mutations entraînent une diminution de l'efficacité de formation de la structure en six hélices de la gp41 corrélée à une diminution de la réplication du virus. De plus ces mutations ne confèrent pas de résistance croisée à d'autres classes d'inhibiteurs d'entrée mais rendent le virus plus sensible aux anticorps neutralisants car elles allongent le temps d'exposition du peptide de fusion dans le milieu extracellulaire [125]. Des études ont également montré qu'il existe dans différents isolats du VIH-1, une grande variabilité de susceptibilité au T-20 corrélée à la conservation de

séquences différentes de son site de liaison, comme par exemple dans la région codant pour la boucle V3 de la gp120 [126]. Ces résultats suggèrent que l'interaction entre la gp120 virale et son corécepteur cellulaire joue un rôle dans la susceptibilité du virus aux inhibiteurs peptidiques de fusion.

D'autres classes d'antirétroviraux ciblant l'entrée virale sont actuellement en cours de développement ou d'essais cliniques, comme les inhibiteurs d'attachement. Par exemple le Fostemsavir se fixe sur la glycoprotéine d'enveloppe gp120 ce qui induit un changement de sa conformation et la perte de sa capacité d'interaction avec le récepteur CD4 [127].

2. Les inhibiteurs de la transcription inverse

Les inhibiteurs de la transcription inverse sont les premiers antirétroviraux à avoir été référencés. Ils représentent plus de la moitié des composés actuellement sur le marché biopharmaceutique et sont regroupés en deux classes distinctes : les NRTIs (nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors) et les NNRTIs (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors). Leur mécanisme d'action est différent mais leur activité rétrovirale est similaire. Ils inhibent l'activité de polymérisation de l'enzyme virale RT ce qui bloque le cycle viral et empêche la production de l'ADN viral double brin fonctionnel.

Les NRTIs nucléosidiques sont des prodrogues, c'est-à-dire que leur activité antivirale nécessite en amont leur phosphorylation par des kinases cellulaires. Les NRTIs nucléotidiques possèdent déjà cette phosphorylation ce qui leur confère une demi-vie plus longue. Les NRTIs sont des analogues des désoxyribonucléotides cellulaires (dNTPs) servant de substrat à la RT et nécessaire pour la polymérisation de l'ADN viral. A l'inverse des bases nucléiques cellulaires, les NRTIs ne possèdent pas de groupe hydroxyle en 3'. L'incorporation de NRTI dans la séquence en cours de synthèse empêche donc la formation de ponts entre le NRTI et un nouvel nucléotide ce qui stoppe la polymérisation de l'ADN. La terminaison de chaîne induite par les NRTIs peut intervenir pendant l'activité polymérase de l'ADN ARN ou ADN dépendante de la RT et peut donc empêcher la synthèse du brin d'ADN (-) ou du brin (+) du génome viral [99,128]. L'apparition de résistance aux NRTIs est médiée par deux phénomènes : l'excision du NRTI de la chaîne naissante grâce à une pyrophosphorolyse ATP-dépendante ou par la discrimination d'incorporation par la RT du NRTI en faveur de désoxyribonucléotides cellulaires [129]. Les mutations de résistance aux NRTIs sur la RT ont ainsi pu être classées en deux groupes : les TAMs (thymidine analog mutations) qui promeuvent la pyrophosphorolyse et les NAMs (nucleoside/nucleotide

associated mutations). La plupart des mutations de résistance aux NRTIs induisent une diminution de l'efficacité de la réplication virale mais cette perte peut être compensée par le virus par l'accumulation de mutations secondaires de résistance.

Les NNRTIs se fixent dans une poche hydrophobe à proximité du site actif de la RT. Cette fixation induit un changement conformationnel de l'enzyme au niveau du site d'interaction avec son substrat et diminue l'activité catalytique de la RT [130]. Le site de liaison des NNRTIs est constitué de l'association de résidus hydrophobes et hydrophiles sur les deux sous-unités (p51 et p66) de la RT. Celui-ci se forme uniquement en présence des NNRTIs [131] et les mutations conférant une résistance à ces antirétroviraux se situent essentiellement dans cette région [132]. A l'inverse de ce qui est observé pour les autres classes d'antirétroviraux, la mutation d'un seul nucléotide peut conférer un haut niveau de résistance aux NNRTIs et seulement une faible diminution de la capacité répliquative de ce virus [133]. Le faible impact sur la réplication contribue à la transmission et à la stabilisation de virus résistants aux NNRTIs dans la population.

3. Les inhibiteurs de l'intégrase

Pour le moment une seule classe d'antirétroviraux ciblant l'IN a été approuvée par la FDA, il s'agit des INSTIs (intégrase strand transfert inhibitors). Ces molécules se fixent sur le site actif de l'enzyme viral et induisent ainsi une inhibition de l'activité catalytique de l'IN. L'intégrase étant au centre de mon projet de recherche, les inhibiteurs d'IN utilisés actuellement en thérapie ART ainsi que ceux en cours de développement seront décrits plus en détail dans la partie III-C de mon manuscrit.

4. Les inhibiteurs de protéase

Les inhibiteurs de protéase (PIs) font partie des antirétroviraux les plus efficaces développés à ce jour, néanmoins leur utilisation nécessite souvent l'administration d'agents stimulant nommé PKE (pharmacokinetic enhancer) pour augmenter leur efficacité [134]. Les PIs actuellement approuvés par la FDA se fixent au niveau du site actif de la PR et empêchent ainsi le clivage des différents précurseurs protéiques présents dans la particule virale immature, ce qui la rend non infectieuse.

La protéase virale PR étant une protéine de petite taille (11 kDa) essentielle à la réplication du VIH-1, il a été initialement supposé que les mutations de résistance aux inhibiteurs ciblant cette enzyme seraient rares. Malheureusement, il existe un fort polymorphisme dans la séquence PR (concernant 49 de ses 99 codons) et plus de 20 mutations aux PIs ont été référencées [135]. L'émergence de résistance aux PIs requière l'accumulation de mutations primaires et de compensation pour rétablir l'efficacité répliquative [136]. Les mutations primaires se situent essentiellement à proximité du site actif de la PR où se fixe à la fois l'inhibiteur et le substrat de l'enzyme. Des mutations additionnelles au niveau des sites de clivage ciblés sur les précurseurs par la PR sont également observées. Ainsi le clivage de sites mutants est plus efficace pour la PR elle-même mutée ce qui compense la perte de l'efficacité de réplication associée à la première mutation de la PR [121]. Comme les PIs ont une structure similaire, l'apparition de mutations conférant une résistance simultanée à plusieurs molécules de cette classe d'inhibiteur a pu être observée.

La co-cristallographie de la PR en présence de ses différents substrats a permis de déterminer une structure commune au niveau des sites de clivage ciblés par la PR [137]. Les PIs étant en contact avec à la fois la PR et cette structure commune sur les différents substrats. Des inhibiteurs synthétisés pour interagir plus spécifiquement avec cette structure conservée sur les sites de clivage des précurseurs polypeptidiques pourraient être plus efficaces notamment sur les virus résistants aux PIs actuels [138]. Une nouvelle classe d'inhibiteurs, les inhibiteurs de maturation dérivés du Bevirimat [139], est actuellement en développement préclinique et clinique (Ira Dicker). Leur mécanisme d'action est de se lier au niveau des sites de clivage reconnus par la PR sur le précurseur Gag et d'empêcher ainsi la maturation de ce précurseur Gag, étape indispensable aux particules virales pour acquérir leur capacité d'infectivité.

C - Les limites des traitements actuels

1. La variabilité génétique

La pandémie de SIDA a été principalement engendré par l'infection par les VIH-1 du groupe M. La diversité actuelle au sein de ce groupe est le résultat d'évolutions subséquentes et de la propagation dans les différentes populations humaines. Sur la base d'analyses phylogénétiques, le groupe M du VIH-1 a été subdivisé en 9 sous types (A-D, F-H, J, K). Le sous type C est prédominant dans la pandémie car il représente plus de la moitié des infections au VIH-1 [140]. L'ampleur mondiale de l'épidémie a engendré une grande

variabilité génétique au sein de ces différents sous-types. De plus des virus mosaïques CRFs (circulating recombinant forms) apparus suite à l'infection d'une même population par de multiples sous-types ont été mis en évidence [141].

Cette variabilité génétique virale représente donc une barrière à l'éradication et au développement d'outils de dépistage de l'infection par le VIH-1. Il existe notamment une forte divergence dans les séquences des gènes *gag* et *env* des différents sous-types. En effet 20 à 30% de différences sont observées dans le gène *env*, ne facilitant pas la production d'anticorps reconnaissant des épitopes d'enveloppe virale. La variabilité au niveau de la boucle V3 de la gp120, responsable de la reconnaissance du corécepteur cellulaire, est actuellement un des obstacles majeurs à l'élaboration de vaccins préventifs à large spectre.

2. Les mutations de résistance

A l'heure actuelle une diminution de la virémie sous un seuil cliniquement détectable est observable chez les patients traités. Cependant ces thérapies sont limitées par l'émergence et la transmission de virus résistants ou multi résistants aux différentes classes d'antirétroviraux actuellement sur le marché [142]. Afin de restreindre ce phénomène, les traitements ART sont pris à vie et combinent plusieurs molécules ciblant différentes étapes du cycle réplcatif du VIH-1.

Chez un individu non traité, il y a en moyenne 10^4 à 10^6 virus VIH-1 par ml de sang. L'enzyme virale RT catalysant l'étape de transcription inverse commet des erreurs et peut ainsi introduire en moyenne une mutation tous les 10^4 nucléotides en cours de synthèse. Sachant que le génome du VIH-1 fait est composé d'environ 10^4 nucléotides, une voire plusieurs mutations / cycle de réplication peuvent donc être générées [121]. Cette grande diversité génétique confère aux différents variants du VIH-1 une sensibilité réduite à une ou deux classes d'antirétroviraux souvent préexistante à la mise en place de la thérapie [143].

Des virus transmissibles et porteurs de résistance ont été observés, à la fois chez des patients en échec thérapeutique mais aussi chez des patients pas encore traités, pour chacune des classes d'antirétroviraux actuellement commercialisées. Les tests de résistance sont donc préconisés avant la prescription d'ART ou avant la modification d'un traitement déjà en place chez des patients en échec thérapeutique.

Le succès des thérapies ART est donc dû, au moins partiellement, à la combinaison de différents composés. Cela permet de diminuer la probabilité de sélectionner un clone viral

porteur de mutations multiples lui conférant une résistance à l'ensemble des molécules utilisées. L'évolution perpétuelle du VIH-1 lui confère donc une forte capacité d'échappement aux traitements actuels, y compris aux molécules les plus récentes et efficaces. C'est pourquoi le développement de nouvelles classes d'antirétroviraux est toujours nécessaire.

3. Les réservoirs viraux

L'existence de réservoirs viraux, pouvant être un type cellulaire ou un site anatomique dans lesquels le VIH-1 est capable de se répliquer malgré la prise de traitement, représente également un obstacle à l'éradication de l'infection.

Les rebonds de virémie peuvent être associés à des réservoirs dits anatomiques. Il s'agit de certains organes, comme le cerveau et les testicules, où la réplication du virus persiste suite au manque d'accessibilité des différents antirétroviraux à ces compartiments [144,145].

Il a été montré que le cerveau représente également un réservoir cellulaire car il contient des cellules microgliales, macrophages résidents du système nerveux central, pouvant être infectées par le VIH-1 de manière latente [146].

Les réservoirs cellulaires peuvent être de persistance, lorsque les cellules infectées ont une demi-vie longue et sont moins sensibles aux effets cytopathiques associés à l'infection par le VIH-1. Les réservoirs cellulaires de latence sont quant à eux caractérisés par un état d'infection non productif mais réversible après réactivation.

La majorité des LT CD4 dans l'organisme sont dans un état quiescent cependant la mise en place de la latence virale dans ces cellules est un événement rare ($1/10^6$). La latence est qualifiée de pré-intégrative lorsqu'elle concerne des LT CD4 naïfs infectés dans un état quiescent, et de post-intégrative quand l'infection se déroule sur des LT CD4 activés qui retournent ensuite dans un état de quiescence afin de devenir mémoires [147]. Lors de la prise de traitement ART à long terme, les LT CD4 mémoires infectés de manière latente représentent le réservoir de latence viral majeur. Ces cellules ont une demi-vie longue (44 mois) durant laquelle la réactivation peut avoir lieu et permettre la production de nouvelles particules virales [148]. La compréhension des mécanismes du maintien et de la réactivation de la latence, tel que l'environnement chromatinien et l'implication de facteurs cellulaires, est donc essentielle à l'éradication future de l'infection par le VIH-1.

III - Interaction IN-LEDGF : cible des INLAIs

A - L'intégrase du VIH-1

1. Les étapes de l'intégration

L'intégration est l'étape clé du cycle réplcatif du VIH-1 durant laquelle le génome viral, préalablement rétrotranscrit en ADN double brin linéaire, est introduit de manière permanente dans le génome de l'hôte. Cette dernière étape de celles dites précoces est divisée en trois réactions enzymatiques successives. Les deux premières réactions sont catalysées par l'enzyme virale intégrase (IN) : le 3' processing et le transfert de brin [149]. La dernière étape de réparation de l'ADN dépendant de la machinerie cellulaire n'est pas encore clairement élucidée. L'ensemble des réactions comprises dans l'étape d'intégration est schématisé dans la figure 12.

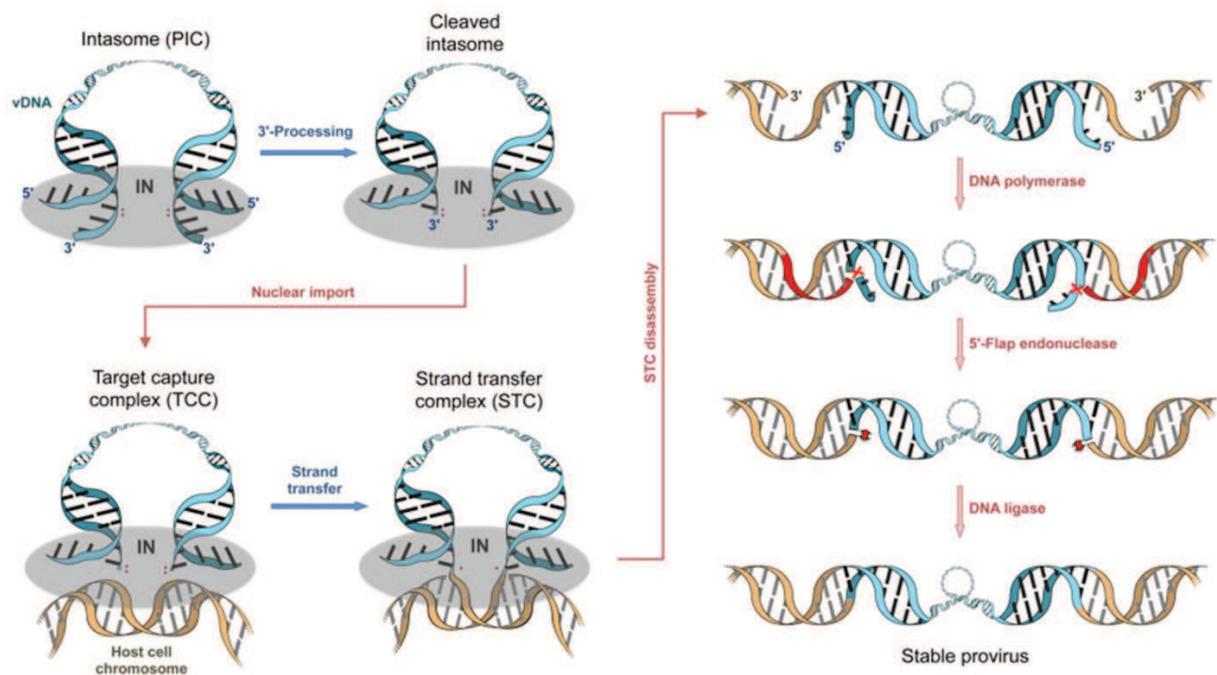


Figure 12 : Différentes réactions enzymatiques de l'intégration du génome viral VIH-1.

Les réactions catalysées par l'enzyme virale IN sont marquées d'une flèche bleue, celles par des enzymes cellulaires d'une flèche rouge. L'ovale gris représente un tétramère d'IN. Les points rouges symbolisent les ions Mg^{2+} au niveau du site actif [150].

A ce stade de la réplication du VIH-1, le génome viral sous forme d'ADN double brin vient d'être rétrotranscrit et fait partie du complexe PIC (pre integration complex). Lors de l'infection virale, chaque particule virale formera un seul PIC par cellule, ce faible niveau de représentation est un frein pour la caractérisation de ce complexe.

Malgré le fait que de l'ADN viral non intégré sous forme circulaire soit quantifiable durant l'infection [151], ces formes circulaires sont environ dix fois moins nombreuses que l'ADN viral linéaire dans les cellules infectées. Il a été démontré que l'ADN viral linéaire présent dans le PIC correspond à la matrice directe pour l'intégration [152].

L'IN procède en partie comme les protéines de la famille des transposases à ADN avec une activité de transestérification phosphodiester [153] sans formation d'intermédiaires covalents de complexe IN-ADN.

a) *La réaction 3' processing et l'auto-intégration*

La réaction de 3' processing permet la maturation des extrémités LTR de l'ADN viral. Elle est médiée par un complexe nommé intasome composé de deux dimères d'IN associés aux séquences LTR de l'ADN viral linéaire double brin [154]. L'IN hydrolyse la liaison phosphodiester au niveau des LTR entraînant l'excision d'un dinucléotide GT en 5' et la libération de groupements hydroxyle en 3' (3'OH) sur chacun des brins de manière synchrone. Cette activité endonucléase de l'IN est strictement spécifique du dinucléotide CA qui précède le site de clivage. La mutation de ces deux nucléotides abolit totalement la réaction.

La réaction 3' processing est la seule étape de l'intégration se déroulant dans le cytoplasme, elle est donc séparée de manière spatiale et temporelle de l'étape suivante de transfert de brin. L'isolement et le confinement de l'ARN viral mature au sein du PIC augmente la probabilité de créer des produits viraux d'auto-intégration détectables dans les cellules infectées [155]. Les formes non intégrées d'ADN viral issues de l'auto-intégration proviennent de l'insertion d'une extrémité 3'OH libre au sein de l'ADN viral lui-même résultant en la formation de cercles d'ADN tronqués ou réarrangés. Il a été démontré que les DNases du complexe cellulaire SET sont capables d'inhiber le processus d'auto-intégration lors de l'infection au VIH-1 [156].

b) *Le ciblage de l'ADN génomique et la réaction de transfert de brin*

Après avoir franchi la membrane nucléaire, l'intasome comprenant désormais un ADN viral maturé, avec des extrémités 3'OH libres, forme un nouveau complexe nommé TCC (target capture complex) ayant la capacité de se lier au génome de l'hôte [150].

L'environnement chromatinien et la localisation génomique dans lesquels le génome viral est intégré sont déterminants pour le devenir de la réplication virale. En effet l'intégration dans des régions transcriptionnellement actives permet une expression virale efficace. Au contraire la mise sous silence transcriptionnelle du génome viral peut aboutir à l'établissement de réservoirs de latence [157,158]. Bien que l'interaction entre l'IN et les extrémités du génome viral soit structure et séquence spécifique, l'IN seule ne possède qu'une très faible sélectivité des sites d'intégration sur le génome de l'hôte. L'alignement de séquences des sites d'intégration a tout de même révélé l'existence de séquences palindromiques consensus spécifiques de différents rétrovirus. Cependant ces séquences consensus ne sont retrouvées qu'à un faible taux et concernent uniquement les paires de bases environnantes du site d'intégration [159,160]. Avec l'apparition du séquençage haut débit des sites d'intégration, il a été démontré que les différents rétrovirus possèdent des spécificités distinctes de ciblage des sites d'intégration également variables en fonction du type cellulaire [161]. Le VIH-1 cible préférentiellement des régions transcriptionnellement actives dans des gènes riches en introns grâce à l'interaction de l'IN avec différents facteurs cellulaires tels que LEDGF/p75 qui fait l'objet d'une partie plus détaillée dans la suite de mon manuscrit. Au sein du complexe PIC, la protéine virale CA est capable d'interagir avec différentes protéines de la famille des nucléoporines ainsi qu'avec le facteur de polyadénylation CPSF6 (cleavage and polyadenylation specific factor 6) [150]. La déplétion de ces protéines induisant une diminution de l'intégration du génome viral dans des régions transcriptionnellement actives, l'interaction de la protéine CA avec CPSF6 semble également jouer un rôle dans la détermination de sites d'intégration du VIH-1 [162]. Enfin il a été suggéré que le complexe PIC pénétrant dans le noyau via les pores nucléaires, l'intégration se fait préférentiellement dans l'ADN cellulaire se trouvant à proximité de ces pores, en périphérie nucléaire, qui se trouvent être des régions contenant des gènes fortement exprimés [163].

La réaction suivante du processus d'intégration, dite de transfert de brin, est une réaction de trans-estérification permettant l'insertion de l'ADN viral au sens strict [164]. Cette étape se déroulant simultanément sur les deux brins maturés de l'ADN viral est coordonnée par le site catalytique de l'IN et nécessite la présence d'ions divalents tels que le magnésium. L'IN

contenue dans le TCC utilise les extrémités 3'OH libres de l'ADN viral comme agent nucléophile afin de cliver le génome cellulaire de manière non spécifique. Cette coupure entraîne la libération d'extrémités cellulaires 5'-PO₄ et leur jonction simultanée par liaison phosphodiester avec les brins opposés maturés de l'ADN viral. Le clivage de l'ADN cellulaire étant réalisé avec un décalage de cinq paires de bases sur chacun des deux brins cela induit la formation d'un gap entre l'ADN de l'hôte et l'ADN viral une fois intégré.

Le complexe post catalytique ainsi formé de multimères d'IN interagissant avec les génomes viraux et cellulaires liés est nommé STC (strand transfer complex) (figure 12).

c) La réparation de l'ADN et la production de formes non intégrées

Il a été démontré que les protéines recombinantes d'IN sont capables de réaliser les réactions de 3' processing et de transfert de brin *in vitro* de manière robuste [165]. Cependant la réparation de l'ADN n'est pas observable dans ces tests d'intégration *in vitro* ce qui suggère que cette réaction fait intervenir des mécanismes cellulaires.

Contrairement aux transposases, la dissociation de l'IN et de son substrat ADN nécessite donc une action extérieure médiée par la machinerie cellulaire. Le désassemblage du complexe STC permet l'élimination de l'extrémité virale AC non appariée et la réparation du gap formé lors du transfert de brin.

Il a été démontré que l'IN du VIH-1 est sensible à l'ubiquitination et que sa dégradation est dépendante de la voie du protéasome [166]. Une interaction entre l'IN et les protéines cellulaires ubiquitines ligases E3 et RAD18 impliquées dans la réparation de gaps de l'ADN a été démontrée [167]. Néanmoins l'extinction de la protéine RAD18 n'induit pas de diminution de la réplication du virus [168]. Il a depuis été mis en évidence que la sous unité de la préfoldine chaperonne VBP1 (von Hippel-Lindau binding protein 1) et la ligase Cul2/VHL (cullin2-based von Hippel-Lindau ubiquitin ligase) sont impliquées dans la dégradation de l'IN par la voie cellulaire du protéasome essentielle à la réplication du VIH-1 [169].

La première étape de la réaction de réparation de l'ADN, correspondant au désassemblage du complexe thermodynamiquement stable STC et à la dégradation de l'IN, favoriserait l'accès aux sites de réparation sur l'ADN pour la machinerie cellulaire. Afin de compléter le processus d'intégration les activités de polymérase du gap de l'ADN, d'endonucléase du dinucléotide AC non apparié, et de ligase sont alors nécessaires.

Les premières études étaient des approches biochimiques ayant pour but de tester *in vitro* les différents enzymes cellulaires candidates pouvant être impliquées dans le processus de réparation de l'ADN. Ainsi ils ont pu mettre en évidence que l'enzyme polymérase β de l'ADN, l'endonucléase FEN1 et la ligase I intervenant dans la voie de réparation par excision de bases BER (base excision repair) semblent jouer un rôle dans la réparation de gap de l'ADN viral intégré *in vitro* [170]. Des études cellulaires ont pu mettre en lumière l'implication de la voie BER dans la réparation de l'ADN liée à l'intégration de lentivirus [171], cependant il semblerait que ce ne soit pas le seul mécanisme mis en jeu. D'autres études ont montré que l'altération de la voie de réparation des cassures double brin NHEJ (nonhomologous end-joining) affectait la réplication du VIH-1 et la survie des cellules infectées [172]. Le rôle de la voie NHEJ dans la réparation de l'ADN suite à l'intégration et à plus grande échelle son rôle dans l'infection sont controversés [173]. Il a également été proposé que la voie de recombinaison homologue (HR) puisse intervenir dans la réparation de l'ADN viral néanmoins cela reste encore soumis à discussion car certaines protéines de la voie NR montrent une activité inhibitrice sur l'intégration. C'est le cas de la protéine hRad51 qui est capable d'interagir avec l'IN afin de diminuer son activité catalytique *in vitro* [174] et de dissocier le complexe liant l'IN à l'ADN par la formation de nucléofilaments [175]. Il existe donc un lien entre la protéine hRad51 et l'intégration cependant elle possède de multiples effets, opposés, sur la régulation de cette étape clé du cycle réplcatif du VIH-1 [176].

Une autre alternative proposée était que la réparation soit médiée directement par les protéines virales RT et IN. Dans ce modèle, l'activité polymérase de la RT permet de combler le gap d'ADN et les réactions d'endonucléase et de ligase sont réalisées par l'IN [177]. Cependant les études menées *in vitro* montrent que la RT permet la réparation du gap mais avec une très faible fidélité et que l'addition de l'IN ne permet pas de terminer le processus d'intégration [170]. Ces données vont dans le sens de la thèse selon laquelle la dernière étape d'intégration de réparation de l'ADN après insertion du génome viral nécessite la machinerie cellulaire.

Le produit final de l'étape d'intégration est caractérisé par la présence de l'ADN viral intégré dans le génome viral, dès lors appelé provirus. Il est colinéaire à l'ADN cellulaire et est encadré de la duplication de séquences génomiques courtes. La taille de ces séquences dupliquées varie en fonction du type de rétrovirus. Pour les lentivirus dont le VIH-1 ces séquences ont une taille de cinq paires de bases.

Bien que l'intégration du génome viral au sein de celui de l'hôte soit une étape majeure essentielle à la réplication des rétrovirus ce processus semble être un évènement rare car la quantification des différentes formes d'ADN viral dans les cellules infectées montre un ratio

d'environ 1/10 entre les formes d'ADN viral intégré et l'ADN viral total [178]. Ainsi lors de la réplication du VIH-1, différentes formes d'ADN viral non intégrées sont quantifiables dans le noyau de cellules infectées. Plusieurs études portant sur ces formes d'ADN ont pu mettre en évidence que l'ADN non intégré possède un rôle dans le cycle viral en servant de matrice pour l'expression des gènes codant pour les protéines précoces [179]. Les ADN circulaires non intégrés étant très stables ils pourraient jouer un rôle en tant que réservoir d'ADN viral lors de l'établissement de la latence pré-intégrative.

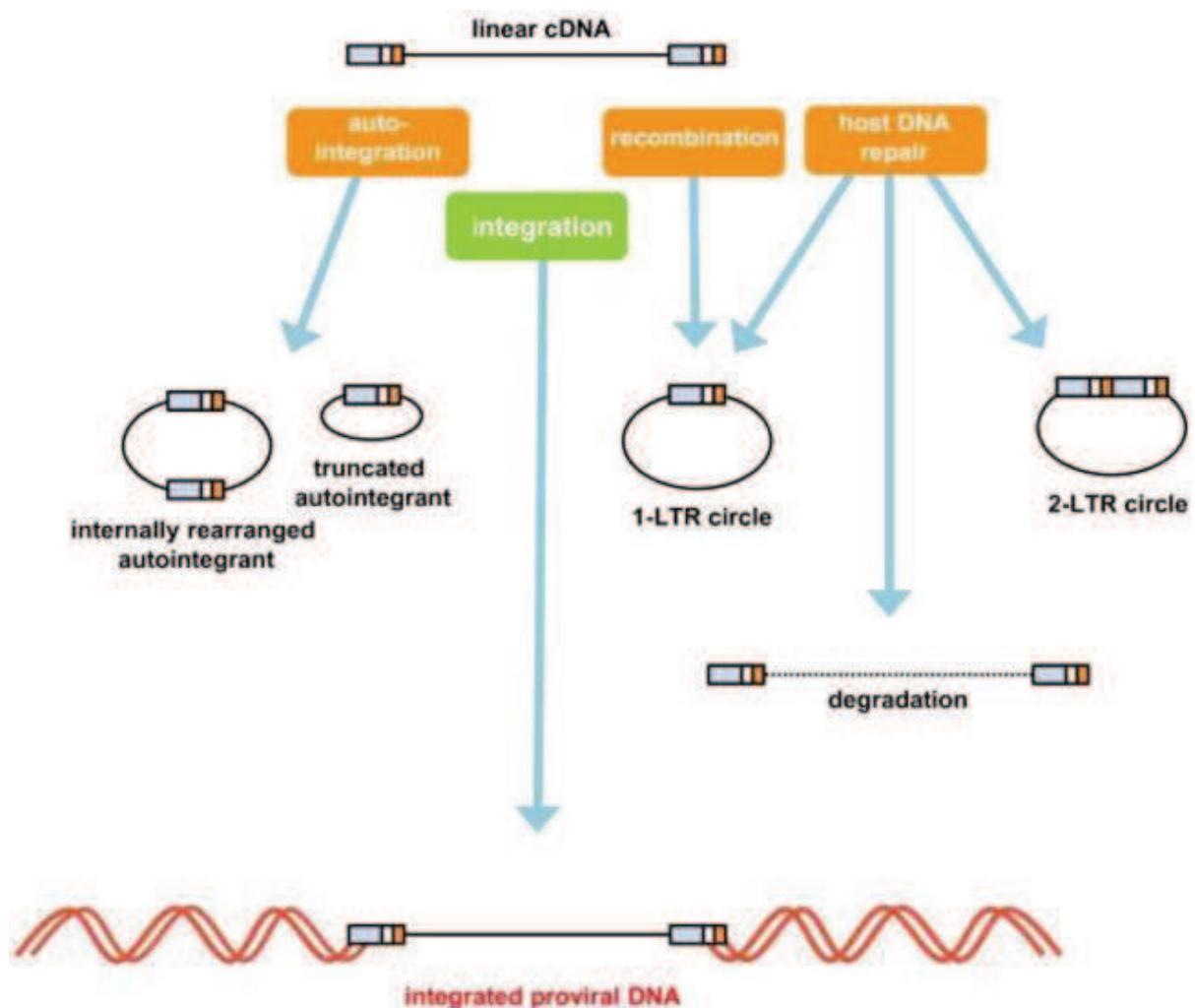


Figure 13 : Les différentes formes d'ADN viral non intégrées.

L'ADN viral double brin sert de matrice pour la formation de structures non intégrées supplémentaires au provirus, telles que les formes d'auto-intégration, les formes 1-LTR et 2-LTR issues d'évènements de recombinaison et des mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN [179].

Les formes circulaires d'ADN non intégrées les plus abondantes sont les cercles à 1-LTR. Elles sont essentiellement retrouvées dans le noyau des cellules infectées (90%) cependant une petite portion d'entre elles sont également localisées dans le cytoplasme (10%). Il a été démontré que la formation des cercles 1-LTR fait intervenir plusieurs mécanismes. Les formes 1-LTR présentes dans le noyau résultent de la recombinaison homologe entre deux extrémités LTR d'un même ADN viral linéaire mûré nécessitant des mécanismes de réparation cellulaire [180] (figure 13). Les formes 1-LTR cytoplasmiques apparaissent quant-à-elles lors du second saut de brin de la transcription inverse [181].

Les formes circulaires 2-LTR beaucoup moins abondantes, sont exclusivement produites dans le noyau via la liaison des extrémités LTR mûré d'un même ADN viral par la machinerie NHEJ [182] (figure 13). Elles constituent un support d'information génétique viral pouvant jouer un rôle dans lors de la latence [183].

2. Les autres activités impliquant l'IN

L'IN est capable de catalyser les réactions de 3' processing et de transfert de brin au cours de l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte. *In vitro* une troisième activité catalytique de l'IN a pu être mise en évidence. Il s'agit d'une réaction dite de désintégration qui consiste à la réaction inverse du transfert de brin [177]. Contrairement aux réactions de 3' processing et de transfert de brin, la désintégration ne nécessite que le core catalytique de l'IN. Malgré le fait qu'aucune preuve de ce processus n'ait été montrée dans des tests *in vivo*, cette activité de l'IN est utilisée dans des études fonctionnelles de l'activité catalytique de l'enzyme [184].

L'IN possède également une activité de clivage *in vitro* des formes 2-LTR au niveau de séquences palindromiques situées à la jonction des sites LTR-LTR [185,186]. Cette activité d'endonucléase est réalisée de manière symétrique sur les deux brins d'ADN des formes 2-LTR et cible les régions présentes en 3' du motif CA de la réaction 3' processing. Cependant l'apparition d'extrémités correspondant à ce processus n'a pas encore été mis en évidence *in vivo*.

Plusieurs classes de mutants de l'IN ont été rapportées. Les mutations de classe I correspondent à une substitution au niveau du site actif de l'enzyme [187] et sont associées à l'accumulation de formes 2-LTR. Les mutants de l'IN de classe II ont des effets phénotypiques différents. Ils possèdent un défaut dans leur réplication pouvant intervenir à différentes étapes du cycle mais conservent au moins partiellement une activité enzymatique

de l'IN *in vitro*. La majorité de ces mutations induisent une diminution de la transcription inverse mais elles peuvent également perturber l'assemblage des virions [150]. Les effets de pléiotropie de ces mutants de l'IN sont des indicateurs du fait que l'IN peut jouer un rôle important lors de la réplication du VIH-1 indépendamment de l'étape d'intégration. Il a notamment été démontré que l'IN peut moduler l'efficacité de transcription inverse en interagissant avec la RT [188]. De plus une activité de l'IN lors de la maturation protéique des virions ainsi qu'au niveau de l'interaction avec l'ARN viral empaqueté a été rapportée suite à études portant sur les inhibiteurs allostériques de l'interaction IN-LEDGF décrits plus loin.

3. La structure protéique de l'IN

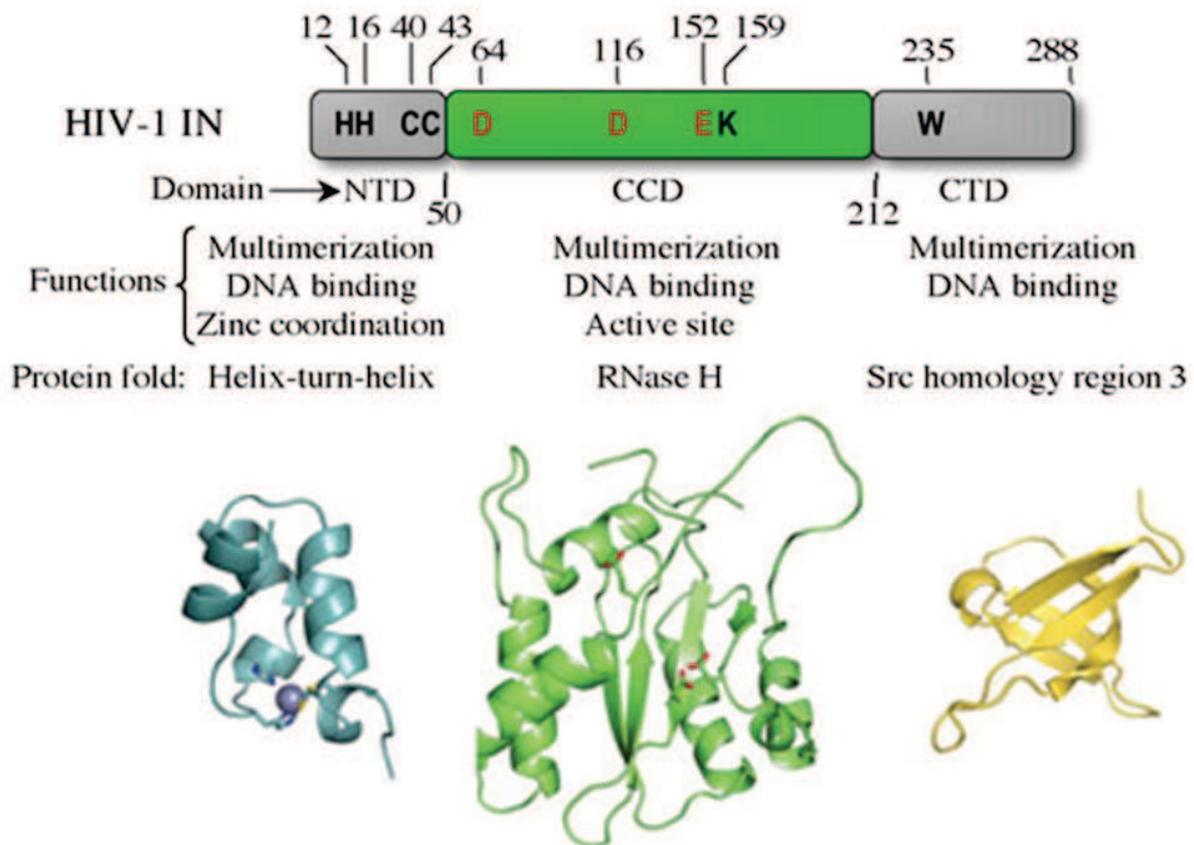


Figure 14 : les différents domaines fonctionnels de l'IN du VIH-1.

L'IN contient trois domaines structuraux conservés chez tous les rétrovirus reliés par des régions flexibles plus variables. Le domaine NTD (en bleu) avec un motif HHCC fixant le zinc, le domaine CCD (en vert) contenant la triade catalytique DDE (marquée ici en rouge) et le domaine CTD (en jaune) arborant une structure de type SH3. Adaptée à partir de [189,190].

L'intégrase du VIH-1 est une protéine de 32 kDa composée de 288 acides aminés codée par le gène pol. Elle est libérée dans les particules virales lors de la maturation de la région C-term du précurseur polypeptidique Pr160^{gag-pol} par la protéase virale. Il s'agit d'une protéine très conservée entre les différentes espèces de rétrovirus. L'IN du VIH-1 est constituée de trois domaines distincts : le domaine N-terminal (NTD), le core catalytique (CCD) et le domaine C-terminal (CTD) représentés dans la figure 14.

La structure de ces trois domaines indépendants et isolés a été caractérisée sur l'IN de plusieurs rétrovirus par cristallographie aux rayons X ainsi que spectroscopie à résonance magnétiques [150]. Cependant à ce jour aucune structure en trois dimensions de l'intégrase entière n'a pu être résolue.

a) Le domaine NTD

Le domaine N-terminal (NTD) est composé des résidus de 1 à 49 de l'IN. Le NTD possède une conformation constituée de trois hélices α stabilisées par la fixation d'une molécule de zinc (Zn^{2+}) au cœur de sa structure. Ce domaine contient un motif conservé chez les rétrovirus et les transposons de type HHCC (composé des acides aminés His₁₂, His₁₆, Cys₄₀ et Cys₄₃) permettant la fixation de l'ion métallique Zn^{2+} [191]. Souvent assimilé à un domaine en doigt de zinc, le NTD possède une structure plus proche d'un domaine hélice-tour-hélice de liaison à l'ADN [192]. La liaison de Zn^{2+} sur ce motif HHCC favorise l'oligomérisation de l'IN en dimères ou en tétramères [193].

En plus de sa capacité à induire la multimérisation fonctionnelle de l'IN, le domaine NTD a été décrit comme jouant un rôle dans la fixation de l'IN à l'ADN [194]. En outre, certaines études ont suggéré l'implication du domaine NTD dans l'étape de transcription inverse car l'altération par mutagenèse dirigée de cette structure est corrélée à une diminution de la quantité d'ADN viral rétrotranscrit [195].

Pour d'autres *Retroviridae*, les spumavirus, les ϵ - et γ -rétrovirus, la protéine IN arbore un motif supplémentaire en amont du NTD. Il s'agit d'une région constituée d'environ 40 acides aminés nommé domaine d'extension au NTD (NED) [154,196].

b) Le domaine CCD

Le domaine contenant le core catalytique (CCD) correspondant aux résidus 50 à 212 de l'IN contient le site actif de l'enzyme DDE composé des acides aminés carboxyliques invariants Asp64, Asp116 et Glu152 [197]. Cette triade catalytique permettant la fixation de deux cations divalents Mg^{2+} ou Mn^{2+} formant des liaisons avec l'ADN est strictement requise pour l'activité enzymatique de l'IN [198]. La cristallographie du domaine CCD a révélé une structure proche de celle de la famille des nucléotidyltransférases tel que l'enzyme bactérienne et virale RNase H, les transposases ou encore la recombinaison RAG1 [199,200].

Il semblerait que l'un des cations, de Mg^{2+} ou de Mn^{2+} , est chélaté par l'IN alors que le second doit être stabilisé par la fixation de l'ADN [201]. L'ion métallique Mg^{2+} étant plus abondant, les réactions d'intégration catalysées en présence de Mg^{2+} sont considérées comme pertinentes et les plus physiologiquement représentatives. La présence d'ion Mg^{2+} rend l'IN plus sensible aux variations de séquence aux extrémités de l'ADN substrat et permet ainsi une réaction d'intégration plus spécifique [202].

D'autres résidus sont impliqués dans l'activité catalytique de l'IN. En effet il a été montré qu'une région très flexible dite boucle catalytique, formée des acides aminés 140 à 149 de l'IN, permet l'orientation de la triade DDE. Des études ont mis en évidence que la rigidification de la boucle catalytique ne modifie pas l'interaction IN-ADN cependant cela provoque une diminution importante de l'étape d'intégration catalysée par l'IN [203].

Le domaine CCD joue donc un rôle crucial dans l'activité catalytique de l'IN mais il a également été démontré que son interaction avec l'ADN lui permet notamment de reconnaître les extrémités LTR maturées de l'ADN viral [204]. De plus le domaine CCD seul peut catalyser la réaction de désintégration bien que ce phénomène n'a pas été observé dans des expérimentations *in vivo* avec la protéine IN entière [150].

Les séquences flexibles reliant le CCD au CTD ne sont pas conservées et leur longueur varie en fonction des rétrovirus.

c) Le domaine CTD

Le domaine C-terminal (CTD) composé des résidus 213 à 288 est le moins conservé des trois domaines de l'IN. Le CTD possède une structure en feuillets β dont le repliement est analogue aux domaines SH3 (Scr homology 3) impliqué dans les interactions protéine-

protéine [205]. Le domaine CTD est structurellement proche des domaines liant la chromatine de la famille des protéines Tudor.

Le CTD permet la fixation de l'ADN viral ou cellulaire indépendamment de sa séquence ou de la présence d'ions métallique, il s'agit donc d'un phénomène non spécifique [206]. Il semblerait également qu'il soit impliqué dans l'oligomérisation fonctionnelle de l'IN [207]. En effet il a été démontré que les domaines NTD et CTD jouent un rôle dans l'étape d'intégration car ils forment des liaisons avec le substrat ADN et sont également cruciaux pour l'assemblage et la stabilisation des différents intermédiaires IN-ADN de l'intasome [208].

4. La multimérisation fonctionnelle de l'IN

Il est intéressant de noter que plus de 250 copies d'IN sont empaquetées dans une seule particule virale VIH-1 contenant uniquement deux copies d'ARN [209]. L'IN est donc en large excès par rapport à son substrat ADN viral qui ne nécessite que deux sites catalytiques pour être intégré dans le génome de l'hôte.

In vitro, une protéine recombinante IN est capable d'induire les réactions de 3' processing et de transfert de brin sur un ADN matrice, cela suggère que l'enzyme virale possède des mécanismes spécifiques de distinction de l'ADN viral ou cellulaire. Des expérimentations de mutagenèse montrent que des mutations de l'IN peuvent moduler indépendamment l'une ou l'autre de ses activités catalytiques ou l'affinité avec l'un ou l'autre de ces types d'ADN. Il semblerait donc que l'IN possède au minimum deux sites ou structures distincts impliqués dans ces mécanismes [210].

En solution la proportion de différentes formes d'IN est à l'équilibre. La protéine est retrouvée sous forme de monomère, dimère, tétramères et de structures de plus haut point moléculaire pouvant correspondre à des octamères ou des agrégats [211]. Cet équilibre est variable en fonction de différents facteurs dont la présence d'ADN ou la concentration de l'enzyme [212,213].

L'insolubilité et la flexibilité de séquences liant les trois domaines fonctionnels de la protéine IN du VIH-1 sont un frein pour la résolution de sa structure tridimensionnelle globale par cristallographie. Cependant la conformation des domaines seuls ou couplés deux à deux a pu être révélée [199,214]. Les premières études en cristallographie de la structure de l'IN ont permis de capturer une majorité de domaine CCD sous forme de dimères. Cependant des

études biochimiques ont rapidement mis en évidence que la multimérisation de l'IN en tétramère est essentielle pour l'intégration de l'ARN viral [215,216].

La cristallisation de l'IN du spumavirus PFV-1 (Prototype Foamy virus), beaucoup plus soluble, sous sa forme libre ainsi que complexé avec l'ADN cible au sein de l'intasome fut une avancée majeure dans la caractérisation de la structure de l'intasome du VIH-1 [154,208] (figure 15). En effet cette structure est corrélée avec les résultats biochimiques précédant faisant l'hypothèse que l'association aux extrémités LTR de l'ADN viral nécessite un tétramère d'IN.

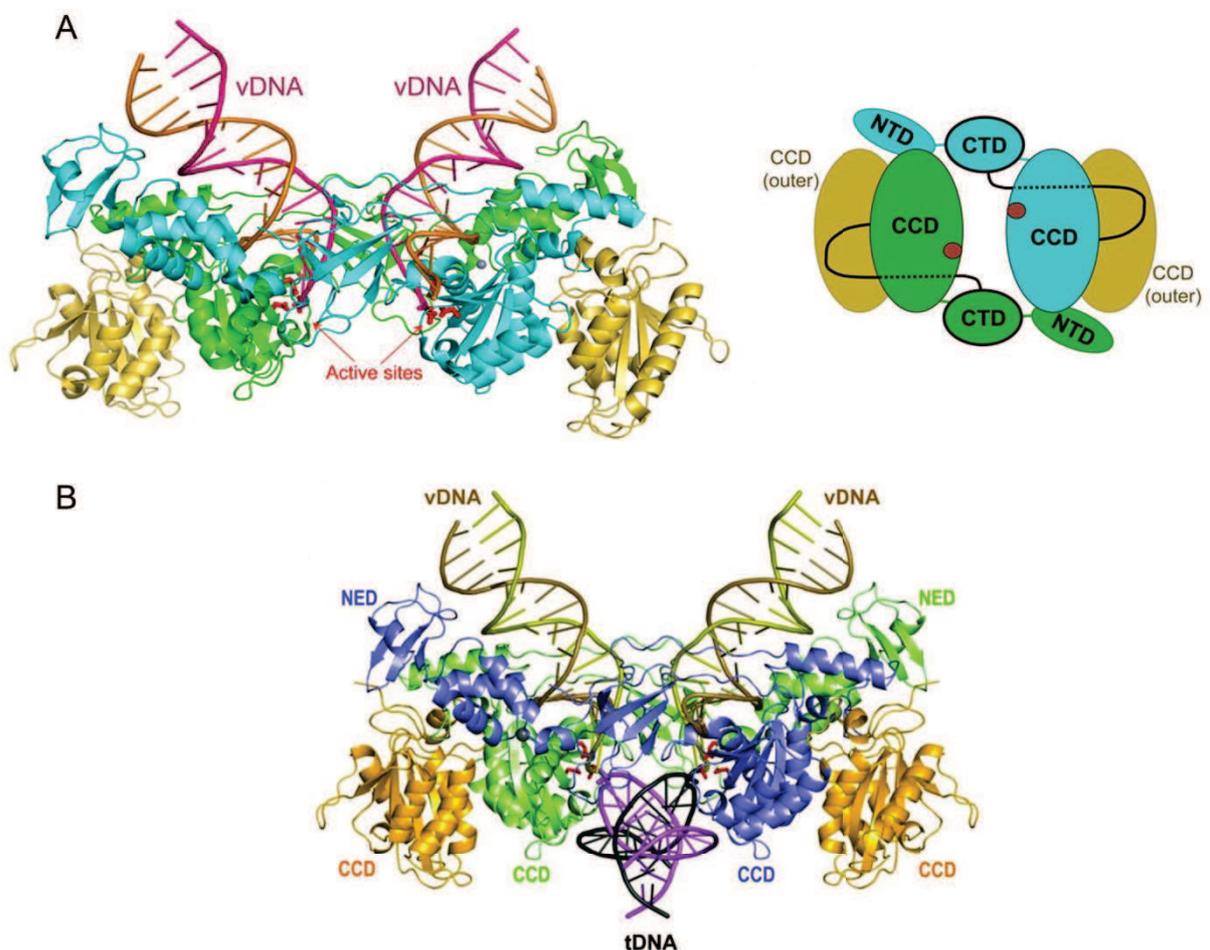


Figure 15 : Structure du complexe IN-ADN du PFV.

(A) Structure et schéma de l'intasome du PFV. Les monomères internes d'IN sont représentés en vert et bleu et une partie de monomères externes en jaune. Les sites actifs en rouge, ainsi que l'ADN viral représenté en double hélice sont également référencés. (B) Structure du complexe TCC (target capture complex) ayant la capacité de fixé l'ADN cellulaire cible représenté ici en double hélice violette. Adaptée à partir de [150,208].

Le terme intasome définit l'interaction entre l'IN et l'ADN viral et regroupe plusieurs états structuraux intermédiaires décrits précédemment allant jusqu'au produit d'intégration final de la liaison ADN viral et cellulaire associé au tétramère d'IN [217].

L'intasome PFV contient un tétramère d'IN qui possède une architecture en dimère de dimères. Chaque dimère se compose de deux sous unités d'IN interne et externe structurellement et fonctionnellement distinctes. Les monomères internes permettent l'ensemble des interactions avec l'ADN viral et cellulaire via leur site catalytique et interagissent entre elles par leur domaines NTD et CCD respectifs. Les domaines CTD font le pont entre ces différentes régions et permettent la stabilité du complexe en maintenant les CCD espacés (figure 15A).

La structure des monomères d'IN externes n'est pas entièrement résolue car seuls les domaines CCD ont pu être caractérisés. Toutefois les domaines NTD et CTD des sous unités externes ne semblent pas indispensables à la formation de l'intasome du PFV ainsi qu'à la réalisation de la réaction de transfert de brin [218].

Les extrémités LTR de l'ADN viral vont se ficher à l'interface des dimères d'IN et subire la réaction de 3' processing. Les trois domaines NTD, CCD et CTD de chaque monomère interne sont impliqués dans cette interaction et confèrent ainsi la spécificité de reconnaissance de l'IN avec l'ADN viral [154]. En théorie un tel complexe protéine-ADN ne peut se former que lorsque les sites de reconnaissance correspondant aux extrémités 3'OH libres de l'ADN viral sont visibles. Une fois la réparation de l'ADN intégré réalisée, ce processus semble être fondamentalement irréversible.

L'intasome ainsi formé est capable d'induire les réactions de 3' processing et de transfert de brin [219]. Le clivage du dinucléotide GT libère une zone d'interaction au centre du tétramère d'IN, entre les deux monomères internes, qui devient alors accessible pour l'ADN cellulaire. Ainsi l'ADN cellulaire se lie au centre du site d'intégration en adoptant une conformation courbée (figure 15B). La capacité de l'ADN à former cette structure coudée contribue à la sélection des sites d'intégration. Les séquences nucléotidiques rigides riches en purine et pyrimidine ne seront donc pas des régions ciblées par l'IN pour l'intégration dans le génome de l'hôte. L'énergie de déformation de l'ADN est compensée par l'interaction avec les domaines CTD et CCD internes de l'intasome de PFV.

Des études récentes montrent que l'intasome du PFV cible préférentiellement des régions dans la chromatine *in vitro* [220]. De plus la caractérisation de la structure TCC (target capture complex) du PFV contenant l'intasome et le nucléosome a permis de mettre en évidence que l'ADN nucléosidique engagé dans l'intasome est efficacement extrait des

octamères d'histones afin d'adopter la conformation courbée nécessaire à cette interaction [221].

La synapse formée par les domaines CTD des sous unités internes d'IN confère la rigidité du complexe et contribue à la zone d'attachement de l'ADN cellulaire cible. La séparation des domaines CCD d'environ 50 Å via la synapse CTD est essentielle au fonctionnement de l'intasome du PFV.

De manière intéressante la longueur de la région faisant le lien entre les domaines CCD et CTD n'est pas conservée entre les différents rétrovirus. Elle varie de 50 à 60 acides aminés pour les spumavirus et les ε- et γ-rétrovirus jusqu'à 10 résidus pour les α- et β-rétrovirus, alors que les lentivirus possèdent un phénotype intermédiaire.

Le modelage de la structure de l'IN du VIH-1 suggère que les lentivirus possèdent un liaison CCD-CTD suffisamment longue pour permettre la formation d'un tétramère homologue à l'intasome du PFV [222].

Au contraire, l'élucidation récente de la structure des intasomes de l'α-rétrovirus RSV (Rous Sarcoma Virus) et du β-rétrovirus MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) a permis de mettre en évidence une structure en octomères d'IN [223,224]. Il semblerait que l'IN de ces virus compense la petite taille de leur liaison CTD-CCD par l'ajout de deux dimères supplémentaires afin de maintenir une structure d'intasome proche de celle du PFV.

5. Les protéines impliquées dans le PIC et dans l'intégration

a) *Les cofacteurs viraux*

Le complexe de pré intégration PIC est un complexe nucléoprotéique composé de l'intasome mais également de différentes protéines de nature cellulaire et virale. Il a été démontré que le PIC contient les protéines virales de structure matrice (MA) et nucléocapside (NC), la protéine accessoire Vpr, ainsi que l'enzyme virale transcriptase inverse (RT). L'implication et le rôle de la capsid (CA) dans le PIC est encore un sujet soumis à controverse.

Comme décrit précédemment le rôle des protéines de structure dans ce complexe semble principalement être associé à l'import nucléaire du PIC afin que l'ADN viral puisse être intégré dans le génome cellulaire.

L'interaction IN-RT semble jouer un rôle dans l'étape de transcription inverse car la mutation indépendante de chacun des trois domaines de l'IN induit un défaut de transcription inverse [225,226,227]. Cependant le rôle de cette interaction n'est pas encore clairement défini car des études contradictoires montrent que la RT inhibe l'activité catalytique de l'IN [228] ou que l'IN inhibe l'activité de la RT [229] alors que d'autres montrent que la RT est capable de stimuler la réaction de transfert de brin *in vitro* médiée par l'IN [230] et que l'IN augmente l'initiation de la transcription inverse [227].

La NC est un cofacteur de l'intégration *in vitro* [231] et il a été rapporté que des mutants de la NC entraînaient une inhibition au niveau des étapes de transcription inverse et d'intégration dans des cellules infectées [20].

b) Les cofacteurs cellulaires

Le VIH-1 est capable de tirer avantage de la machinerie cellulaire afin de réaliser différentes étapes de son cycle de réplication y compris pour l'intégration. En effet, bien que la protéine IN recombinante purifiée est nécessaire et suffisante pour induire les réactions de 3' processing et de transfert de brin *in vitro*, l'implication de partenaires viraux et cellulaires est essentielle pour l'intégration du provirus dans des cellules infectées.

Contrairement à ce qui est observé avec l'IN recombinante seule, le complexe PIC purifié permet l'insertion des extrémités de l'ADN viral de manière concertée dans le génome de l'hôte en diminuant le phénomène d'auto-intégration [232].

Des tests *in vitro* de l'activité catalytique du PIC [233,234], de crible en double hybride chez la levure [235,236] et de co-immunoprécipitation [211,237] ont été réalisés afin d'identifier les cofacteurs cellulaires de l'intégration rétrovirale.

Le principal cofacteur de la protéine virale IN est la protéine cellulaire LEDGF/p75 (Lens Epithelium-Derived Growth Factor) liée à la chromatine. Cette interaction IN-LEDGF étant la cible des inhibiteurs de l'intégrase en cours de développement sur lesquels sont basés mes travaux de thèse, la protéine LEDGF ainsi que son interaction avec l'IN seront détaillés dans la partie suivante de mon manuscrit.

Plusieurs autres cofacteurs putatifs de l'intégration ont pu être mis en évidence dont les protéines cellulaires HMGA1 et BAF identifiées comme interagissant avec l'ADN viral. En ce qui concerne les cofacteurs de l'IN, d'autres protéines ont été identifiées comme capables d'interagir de manière directe avec l'IN comme INI1, VBP1 et TNPO3 mais avec une affinité

beaucoup plus faible que ce qui est observé pour l'interaction IN-LEDGF. Cependant le rôle de ces cofacteurs dans l'intégration et leur mécanisme d'action restent encore mal définis.

HMGA1 (high mobility group protein 1A) est une protéine associée à la chromatine identifiée comme premier cofacteur cellulaire du PIC [233]. Il s'agit d'une protéine non-histone liant l'ADN dans des régions riches en AT, biologiquement impliquée dans l'activation de la transcription et dans la structure de la chromatine [238]. Les membres de la famille des HMGA possèdent la capacité de fixation à la fois aux protéines et à l'ADN. Dans un contexte infectieux, malgré le fait que HMGA1 n'interagisse pas de manière directe avec l'IN [239] cette protéine cellulaire stimule l'intégration *in vitro* [231]. Le rôle de HMGA1 dans l'intégration n'a pas été entièrement caractérisé mais il semblerait qu'elle agisse en interagissant et en stabilisant les deux extrémités maturées de l'ADN viral dans l'intasome [240]. Les sites potentiels de liaison avec HMGA1 ont été identifiés sur le LTR 5' viral et correspondent aux sites de fixation de l'activateur transcriptionnel AP-1 (activating protein-1) [241]. Des études suggèrent que la liaison du cofacteur HMGA1 à l'ADN viral joue un rôle dans l'activation transcriptionnelle de l'ADN viral en augmentant la fixation d'un autre activateur de transcription ATF-3 associé au recrutement du complexe du remodelage de la chromatine hSWI/SNF [242,243].

Comme son nom l'indique, la protéine cellulaire BAF (barrier-to-autointegration factor) a été à l'origine identifiée comme un composant du PIC du rétrovirus MoMLV (Moloney murine leukemia virus) jouant un rôle dans la diminution du phénomène d'auto-intégration [234]. Plus tard, des expériences de co-immunoprécipitation ont mis en évidence cette activité dans l'intégration du VIH-1 [237]. BAF est une protéine cellulaire liant l'ADN très conservée qui possède un rôle physiologique structural nucléaire. Sa capacité de fixation à la fois à l'ADN mais aussi aux protéines nucléaires comme LAP-2 α (lamina-associated polypeptide) suggère que BAF puisse faire le lien entre la membrane interne et la lamina nucléaires [244,245]. Bien que la stimulation de l'intégration *in vitro* par BAF ait été démontrée, l'implication potentielle du complexe LAP-2 α /BAF/ADN viral dans la réplication du VIH-1 reste à définir. Le rôle de la protéine BAF dans la prévention de l'auto-intégration pourrait être corrélé à sa capacité à maintenir l'ADN viral maturé de façon compacte. Au vue de son aptitude à lier l'ADN, BAF pourrait également jouer un rôle dans l'association de l'ADN viral et cellulaire [246]. D'autres études ont mis en évidence la présence de dimères de BAF incorporés dans les virions VIH-1. De plus BAF semble capable de se lier à la MA sur le précurseur polypeptidique dans les particules virales [247].

INI1, (intégrase interactor 1) a été le premier partenaire cellulaire d'interaction de l'IN à être découvert par Kalpana & coll par crible double hybride dans le laboratoire de Steve Goff

[235]. La protéine INI1, homologue de SNF5 chez la levure, fait partie du complexe humain de réparation de la chromatine hSWI/SNF [248]. INI1 est capable de stimuler l'intégration *in vitro* mais ce phénomène n'a pas été observé à proprement dit *in vivo*. Au contraire, certaines études montrent que INI1 inhibe les étapes précoces de la réplication du VIH-1 [249]. Cependant au sein du complexe hSWI/SNF l'action d'INI1 est vraisemblablement modulée par l'accessibilité aux sites d'interaction sur l'ADN cellulaire et peut ainsi induire une inhibition ou une stimulation de l'intégration [250,251]. Ce complexe est également impliqué dans le ciblage dans des régions de chromatine remodelée de l'intégration [251]. D'autres fonctions d'INI1 sur la réplication du VIH-1 ont été proposées, comme l'implication d'INI1 dans l'acheminement et/ou le passage nucléaire du PIC suite au recrutement cytoplasmique d'INI1 précocement après l'infection. De plus INI1 présent dans les virions semble capable d'interagir avec la protéine IN dans le précurseur polypeptidique ce qui suppose un rôle supplémentaire d'INI1 dans les étapes tardives de l'infection [252].

Une autre protéine virale nommée VBP1 (von Hippel–Lindau binding protein 1) qui est une sous unité du complexe prefoldin chaperone a été identifiée par Mousnier et al. comme capable d'interagir avec l'IN VIH-1 [169]. Dans un contexte infectieux, VBP1 fait le lien entre l'IN et l'ubiquitine ligase cellulaire cullin2 (Cul2)-based von Hippel-Lindau (VHL). VBP1 et Cul2 sont requises pour une réplication du VIH-1 optimale et semblent jouer un rôle dans une étape entre l'intégration et la transcription des gènes viraux. VBP1 et Cul2 sont nécessaires à la polyubiquitylation efficace de l'IN entraînant ainsi sa dégradation par la protéasome. VBP1 semble également jouer un rôle dans un étape du cycle de réplication postérieure à l'intégration, au niveau de la transcription du génome viral.

Un crible double hybride a permis d'identifier la transportin-SR2 (TRN-SR2, TNPO3) comme un partenaire d'interaction caryophile de l'IN [253]. TRN-SR1 and TNPO3 permettent le transport entre le noyau et le cytoplasme des protéines SR (serine/arginine-rich proteins) qui jouent un rôle dans la régulation de l'épissage de l'ARNm [254,255]. TRN-SR1 and TNPO3 sont codés par un seul même gène (*tnpo3*) et leur expression dépend d'un épissage alternatif. Dans la plupart des lignées cellulaires analysées seul la protéine TNPO3 est exprimée alors que l'isoforme TRN-SR1 est indétectable [256]. Dans un contexte infectieux, TNPO3 semble jouer un rôle dans l'import nucléaire du PIC et également faciliter l'infection par le VIH-1. Les différents lentivirus possèdent des niveaux différents de dépendance au facteur cellulaire TNPO3 [257] et l'étape du cycle de la réplication du VIH-1 dans laquelle TNPO3 joue un rôle prédominant est encore un sujet très débattu. Par exemple, il a été suggéré que TNPO3 est impliqué dans une étape en amont de l'import nucléaire [258] ou lors de l'intégration et des étapes tardives de la réplication [83,85,259]. Une étude récente a permis de mettre en évidence que l'interaction entre la protéine cellulaire CPSF6 et la CA

semble être un mécanisme alternatif de ciblage de l'intégration dans des régions transcriptionnellement actives [162]. Sachant que TNPO3 interagit directement avec CPSF6 et l'importe ou la maintient dans le noyau, ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi CA, CPSF6 et TNPO3 semblent influencer le ciblage de l'intégration.

D'autres protéines cellulaires ont été identifiées comme capable d'interagir avec l'IN mais des expérimentations supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer d'une part si cette interaction est directe et d'autre part leur rôle sur la réplication du VIH-1. En effet, ces interactions avec l'IN pourraient être indirecte et médiées par exemple par le complexe PIC, d'autres protéines virales ou cellulaires ou encore par l'ARN viral. C'est le cas de la protéine nucléaire EED (embryonic ectoderm development protein) de la famille des protéines PcG (*Polycomb group*). Ces protéines sont impliquées dans la répression transcriptionnelle des gènes cellulaires via la désacétylation des histones. EED étant capable d'interagir avec l'histone désacétylase et le facteur de transcription YY1, son interaction avec l'IN pourrait avoir un rôle dans le ciblage de l'intégration dans des régions actives du génome de l'hôte [260]. Une interaction entre l'IN et la protéine chaperonne HSP60 (heat shock protein 60) a également été mise en évidence [261]. HSP60 forme un complexe avec HSP10 permettant le repliement fonctionnel de manière ATP-dépendante des protéines « misfolded ». Cette interaction pourrait donc avoir un rôle dans la stabilisation de l'IN. Enfin une interaction de l'IN avec la protéine acétyltransferase p300 a également été rapportée [262]. Physiologiquement p300 interagit avec les histones acétylées et régule la conformation de la chromatine cellulaire, cette interaction IN-p300 pourrait donc moduler l'étape d'intégration du VIH-1.

B - La protéine cellulaire LEDGF/p75

1. La structure et le rôle physiologique de LEDGF

L'interaction de LEDGF avec IN a été découverte indépendamment dans le laboratoire de Richard Benarous à l'Institut Cochin par crible double-hybride en collaboration avec la société Hybrigenics [263], presque simultanément par Peter Cherepanov par co-immunoprécipitation dans le laboratoire de Zeger Debyser [211] et un peu plus tard par Pamela Silver et Alan Engelman [264]. La protéine LEDGF (Lens Epithelium Derived Growth Factor) est une protéine ubiquiste très conservée liée à la chromatine [265]. Bien que la protéine LEDGF codée par le gène cellulaire PSIP1 fut initialement décrite comme un coactivateur transcriptionnel [266,267], ses fonctions physiologiques restent encore à ce jour

mal caractérisées. Malgré le fait que dans un premier temps un rôle extracellulaire de LEDGF dans le développement de l'épithélium fut proposé, ces résultats n'ont pas été corroborés par la suite. Néanmoins le terme inapproprié de LEDGF est toujours couramment utilisé pour décrire cette protéine. Identifiée comme le principal cofacteur de l'IN du VIH-1, la majorité des études portant sur la protéine cellulaire LEDGF ciblent son interaction avec l'IN et son rôle dans un contexte infectieux.

LEDGF appartient à la famille des hepatoma-derived growth factor (HDGF)-related proteins (HRP). Chez les mammifères, cinq membres de la famille des HRP ont été identifiés : HDGF, HRP1, HRP2, HRP3, HRP4 et LEDGF. La famille protéique HRP est caractérisée par la présence d'un domaine spécifique et conservé dans leur séquence N-terminale. Il s'agit d'un domaine PWWP, nommé ainsi car il possède un motif Pro-Trp-Trp-Pro (figure 16).

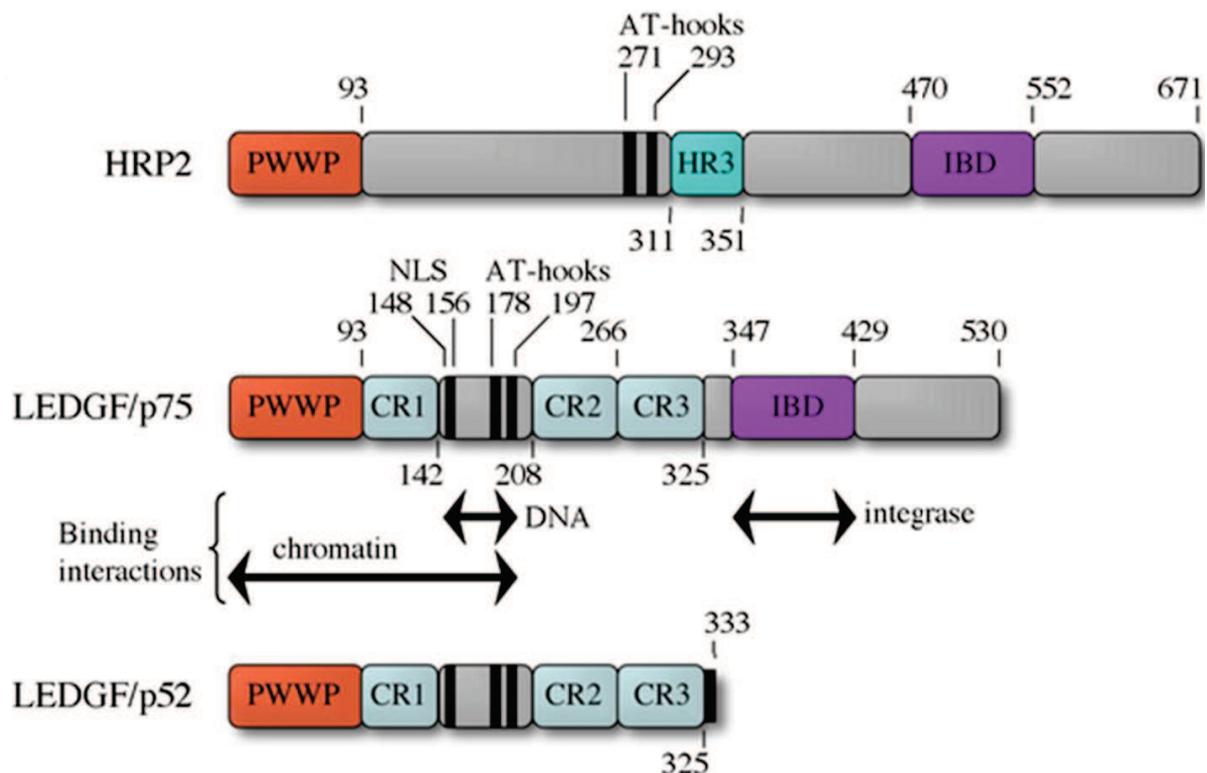


Figure 16 : Organisation structurale des protéines HRP dont LEDGF/p75.

Les protéines HRP sont caractérisées par un domaine PWWP dans leur région N-terminale. HRP2 et LEDGF/p75 possède également un domaine IBD permettant notamment la fixation à l'IN du VIH-1 absent sur LEDGF/p52. Les domaines CR (charged regions) et les « AT-hook-like » sont impliqués avec PWWP interviennent dans la fixation et la modulation de l'ADN chromatinien [189].

La protéine LEDGF/p75 composée de 530 acides aminés contient deux domaines structuraux [268]. En N-terminal, son domaine PWWP est constitué des résidus 1-92, alors que ses acides aminés 347-429 forment un second domaine nommé IBD (intégrase binding domain). Les régions flexibles de LEDGF/p75 possèdent également un signal de localisation nucléaire (NLS) dépendant des importines α/β ainsi que deux motifs « AT-hook-like ». Il a été démontré que tout comme le domaine PWWP, ces différents motifs sont impliqués dans la liaison à l'ADN [269,270,271]. La structure schématique des différents domaines et motifs de LEDGF/p75 est représentée dans la figure 16.

Le domaine PWWP appartient à la famille Tudor des domaines liant la chromatine. Il possède la capacité de se lier aux marques épigénétiques H3K36me3 (trimethylated Lys36 of the histone 3) des nucléosomes fortement enrichies dans les régions transcriptionnellement actives du génome [272]. En effet ces marques H3K36me3 sont associées au mécanisme d'élongation de la transcription. Le domaine PWWP confère donc aux protéines HRP, dont LEDGF, la capacité de se lier à la chromatine.

Le domaine IBD a été identifié comme étant la structure minimale d'interaction de LEDGF/p75 avec l'IN des lentivirus [236,268]. Une forme alternative d'épissage LEDGF/p52 ne possédant pas ce domaine IBD est incapable d'interagir avec l'IN et n'affecte donc pas l'étape d'intégration [236,273]. Ainsi dans la suite de mon manuscrit nous nous intéresserons uniquement à la protéine LEDGF/p75 capable d'interagir avec l'IN du VIH-1 désormais nommée LEDGF par souci de simplicité.

Le domaine IBD est un domaine d'interaction protéine-protéine et permet ainsi la liaison de LEDGF avec de nombreuses protéines cellulaires ayant des fonctions diverses. Parmi ces protéines, plusieurs ont été identifiées comme par exemple le facteur de transcription JPO2 [274,275] et le complexe d'histone méthyltransferase Menin (MLL) impliqué dans la régulation transcriptionnelle et l'oncogenèse [276], ainsi que l'activateur Cdc7 de la kinase de phase S [277]. En fonction de l'organisation de ses domaines, sa localisation nucléaire et les caractéristiques de ses partenaires cellulaires, LEDGF semble jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes et/ou une fonction de protéine adaptatrice l'ancrage de ses différentes partenaires sur la chromatine.

Sur l'ensemble de la famille HRP, la protéine HRP2 est l'analogue le plus proche de LEDGF. La protéine HRP2 possédant également le domaine C-terminal IBD, peut dans certaines conditions interagir avec l'IN du VIH-1 et stimuler son activité catalytique de transfert de brin *in vitro*. Néanmoins cette interaction présente une affinité beaucoup plus faible que l'interaction IN-LEDGF [268]. En présence de LEDGF, la protéine HRP2 ne joue pas de rôle avec l'IN sur la réplication du VIH-1, au contraire en absence de LEDGF, comme dans des

cellules KO n'expriment plus la protéine (LEDGF^{-/-}), HRP2 peut dans une faible mesure suppléer l'absence de LEDGF [278,279].

2. Le rôle de LEDGF lors de l'infection VIH-1

Dans un contexte infectieux, le rôle de LEDGF est d'assurer l'ancrage de l'intégrase sur la chromatine au niveau de sites transcriptionnellement actifs [236,280]. En effet la déplétion du cofacteur LEDGF abolit la capacité de l'IN à se lier à la chromatine. LEDGF qui interagit avec une forte affinité avec les intégrases de différents lentivirus joue donc un rôle majeur dans le ciblage des sites d'intégration du VIH-1 dans le génome des cellules infectées [88] et sur la réplication du VIH-1 [236,281,282]. L'activité de LEDGF sur l'activité catalytique de l'IN fut démontrée dans un premier temps *in vitro* [211].

Dans des cellules KO LEDGF^{-/-}, l'infection par le VIH-1 est fortement diminuée en comparaison à des cellules sauvages. Il a été démontré que ce défaut de réplication du VIH-1 en absence de LEDGF est dû à une inhibition de l'étape d'intégration [281,283,284]. Le phénotype sauvage de l'infection pouvant être restauré par la réexpression de la protéine LEDGF entière ou seulement de son domaine IBD fusionné à un domaine de fixation à la chromatine [285]. Cela démontre la spécificité de l'action de LEDGF, via son interaction avec l'IN, dans l'augmentation de l'infectivité du VIH-1.

Le modèle couramment utilisé pour décrire l'action de LEDGF lors de la réplication du VIH-1 est représenté figure 17. Le complexe PIC décrit précédemment contient l'intasome constitué de l'ADN viral double brin mûri et de l'IN virale. La protéine LEDGF interagit avec l'IN via son domaine C-terminal IBD. LEDGF permet l'ancrage du PIC dans des régions transcriptionnellement actives via son domaine N-terminal PWWP [286]. Ainsi LEDGF joue un rôle clé dans l'étape d'intégration car elle permet son ciblage dans des régions de transcription active de la chromatine de l'hôte qui représente une étape nécessaire à la réplication efficace du provirus.

Des études récentes portant sur la distribution des sites d'intégration dans des cellules n'exprimant plus les protéines LEDGF et/ou CPSF6 ont permis de mettre en évidence que l'interaction entre la protéine virale CA et la protéine cellulaire CPSF6 semble diriger le PIC vers des régions actives contenues dans l'euchromatine alors que l'interaction IN-LEDGF détermine la position effective des sites d'intégration du VIH-1 [162].

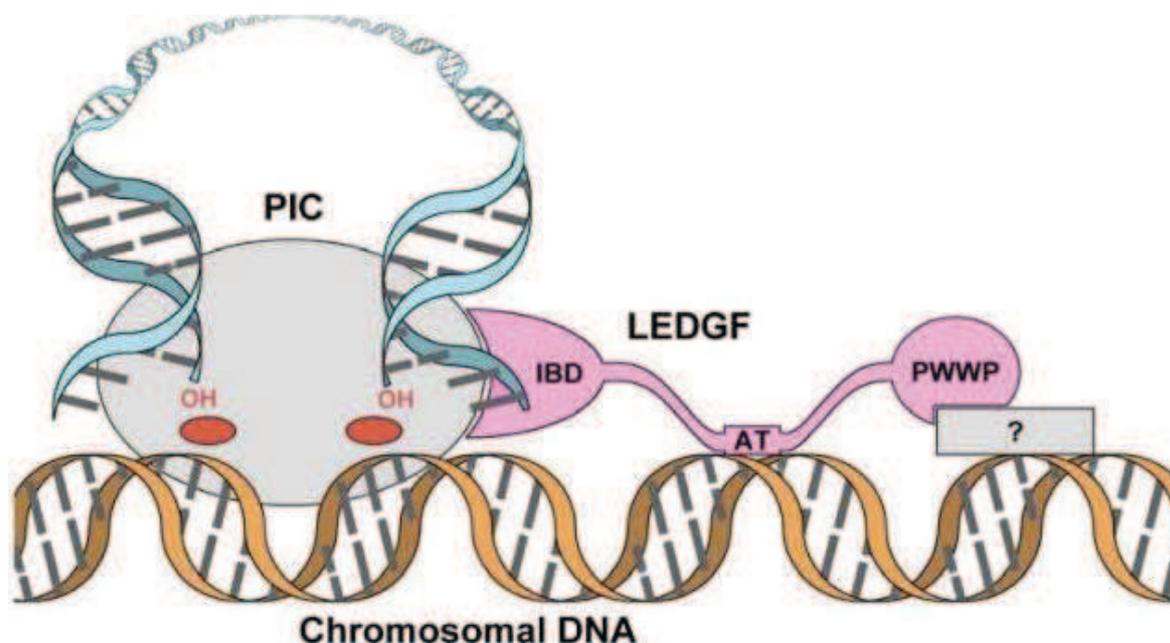


Figure 17 : Interaction en l'IN et LEDGF lors de l'étape d'intégration du VIH-1.

La protéine LEDGF agit comme un agent de liaison à la chromatine permettant l'ancrage du complexe PIC dans des régions transcriptionnellement actives via son interaction directe avec la protéine virale IN contenue dans ce complexe [286].

De plus il a été montré que l'extinction de l'expression de la protéine LEDGF favorise la dégradation de l'IN par la machinerie cellulaire du protéasome [273,287]. LEDGF pouvant interagir avec l'ensemble des IN de lentivirus, il a été montré que le PIC du FIV (feline immunodeficiency virus) peut être immunoprécipité par des anticorps reconnaissant LEDGF [288], cependant aucun résultat n'a permis de mettre en évidence l'implication de la protéine LEDGF dans la protection et l'import nucléaire du PIC du VIH-1.

Enfin dans le laboratoire de Stéphane Emiliani, Gerard et al. ont pu montrer que la protéine LEDGF/p75 pouvait également jouer un rôle dans l'établissement de la latence, indépendamment de son interaction avec l'IN. Dans les étapes post-intégratives du cycle de réplication du VIH-1, LEDGF permet le recrutement des protéines cellulaires Iws1 et SPT6 sur les régions LTR du provirus ce qui empêche l'expression du génome viral intégré [158]. Ainsi la mise sous silence du provirus coordonnée par LEDGF pourrait être associée à l'établissement et au maintien de réservoirs viraux de latence.

3. La structure de l'interface entre IN-LEDGF

La liaison de la protéine LEDGF augmente à la fois l'activité [211,289,290] et la solubilité [280] de l'IN du VIH-1. Ainsi la formation d'un complexe de haut poids moléculaire comprenant IN-LEDGF et 21 paires de bases de la région U5 du LTR de l'ADN viral a pu être résolue [290].

La structure en solution du domaine IBD de LEDGF déterminée en NMR (nuclear magnetic resonance) montre une conformation compacte formée de quatre hélices α reliées par des domaines connecteurs en forme d'épingle exposant des chaînes hydrophobes [291]. Du point de vue viral, le domaine CCD de l'IN est le site majeur d'interaction avec LEDGF, mais le domaine NTD de l'IN présente un site d'interaction additionnel qui confère une plus grande affinité à cette interaction [273]. La structure de l'interface entre l'IN et LEDGF révélée par cristallographie a permis de déterminer les résidus de chaque partenaire impliqués dans l'interaction [289,292].

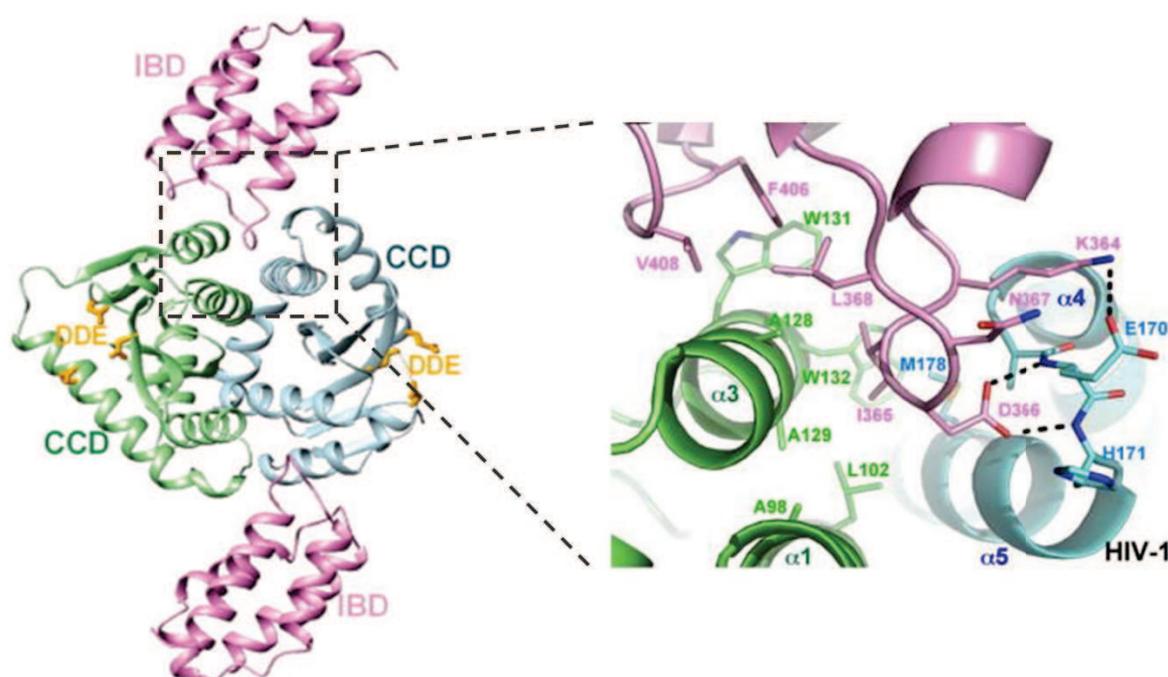


Figure 18 : interface entre IBD LEDGF et CCD IN.

Structure de l'interaction entre un dimère de domaines CCD de l'IN (vert et bleu) et du domaine IBD de LEDGF (rose). Certains résidus de chaque partenaire impliqués dans cette interaction sont indiqués. La triade catalytique DDE de l'IN est représentée en jaune et diffère du site de liaison à LEDGF. Adaptée de [293,294].

L'interaction IN-LEDGF est définie comme une structure de stœchiométrie 1:2 c'est à dire qu'elle est définie par l'association d'une protéine de LEDGF à deux monomères d'IN. Le premier site d'interaction décrit contient deux boucles en épingle dans l'élongation de la structure en hélice du domaine IBD de LEDGF en contact avec l'interface d'un dimère CCD de l'IN sur un site différent de la triade catalytique DDE (figure 18).

Plus spécifiquement, le résidu Ile365 du domaine IBD LEDGF est en contact avec la poche hydrophobe d'IN formée des résidus Leu102, Ala128, Ala129, Trp132 du premier monomère CCD IN et des résidus Thr174 et Met178 du second monomère. Sur le domaine IBD LEDGF l'acide aminé Ile365 établit une liaison hydrogène avec le résidu Gln168 du domaine CCD IN. Alors que le résidu Asp366 de LEDGF forme deux liaisons hydrogènes avec les résidus Glu170 et His171 de l'IN [292]. La seconde boucle de l'IBD LEDGF contient les acides aminés Phe406 et Val408 qui interagissent avec les résidus Ala128 et Trp131 de l'interface du dimère CCD IN.

L'importance de ces différents résidus dans l'interaction IN-LEDGF a été vérifiée par des expérimentations de mutagenèse des deux partenaires. Par exemple, la mutation des résidus Ala128, Ala129, Trp131, Trp132, Gln168, Glu170 et Thr174 sur l'IN abolit sa capacité d'interaction avec LEDGF [189,236,291,292]. De la même manière, la substitution sur IBD LEDGF des résidus aminés Ile365, Asp366, Phe406 et Val408 diminue ou empêche l'interaction avec l'IN.

De manière intéressante, la mutation sur l'IN des résidus Val165, Arg166, Leu172 et Lys173 qui ne sont pas en liaison directe avec les résidus IBD LEDGF, affecte cependant la conformation du connecteur des hélices α 4/5 ce qui perturbe la surface d'interaction IBD LEDGF-CCD IN [292].

Bien que le domaine CCD IN soit essentiel pour permettre l'interaction avec LEDGF, le domaine NTD est requis pour une liaison de haute affinité. En effet une mutation H12N dans ce domaine NTD, perturbant sa structure, empêche également l'interaction de LEDGF avec l'IN ainsi que le ciblage de l'intégration dans des régions transcriptionnellement actives [273]. Les résidus impliqués dans l'interaction IBD LEDGF-NTD IN ont pu être identifiés grâce à la résolution de la structure de cette interface avec l'IN VIH-2 [289]. Dans ce contexte, les résidus Lys401, Lys402, Arg404 et Arg405 de l'IBD LEDGF sont opposés aux acides aminés Glu6, Glu10 et Glu13 sur le domaine NTD IN.

Bien que les complexes d'IN avec la protéine LEDGF entière ou seulement son domaine IBD soient considérablement plus solubles que les formes libres d'IN [286] la structure fonctionnelle complète IN-LEDGF-ADN n'a pas encore été résolue. Néanmoins Michel et

collaborateurs [290] ont montré que les complexes IN entière-LEDGF sont constitués d'un tétramère d'IN interagissant avec deux molécules de LEDGF, le complexe ainsi formé est d'une taille d'environ 250 kDa. Par ailleurs à l'aide d'expérience de cryo electron microscopy, Michel et al. ont pu élucider une structure trois dimensions à 10-14 Å de résolution. D'autres études ont permis de mettre en évidence que la liaison de LEDGF induit la tétramérisation de l'IN *in vitro* [293,295] et que le cofacteur peut partiellement restaurer un défaut de multimérisation d'IN mutée dans son interface CCD-NTD [293]. De plus l'utilisation d'un peptide dérivé des boucles de l'IBD LEDGF est également capable d'induire la tétramérisation de l'IN *in vitro* [296]. Ces résultats suggèrent que la formation de l'interface entre IBD LEDGF-CCD IN pourrait augmenter la stabilisation du tétramère d'IN via la modification allostérique de l'interface CCD-NTD. En effet plusieurs études ont permis de mettre en évidence que malgré la nature hautement dynamique des sous-unités de l'intégrase, la fixation du cofacteur LEDGF stabilise fortement ces interactions et promeut la tétramérisation de l'IN lié à l'ADN viral *in vitro* [295,297]. Les interactions entre l'IN, l'ADN viral et LEDGF correspondant à la stabilisation du complexe sont représentées dans la figure 19.

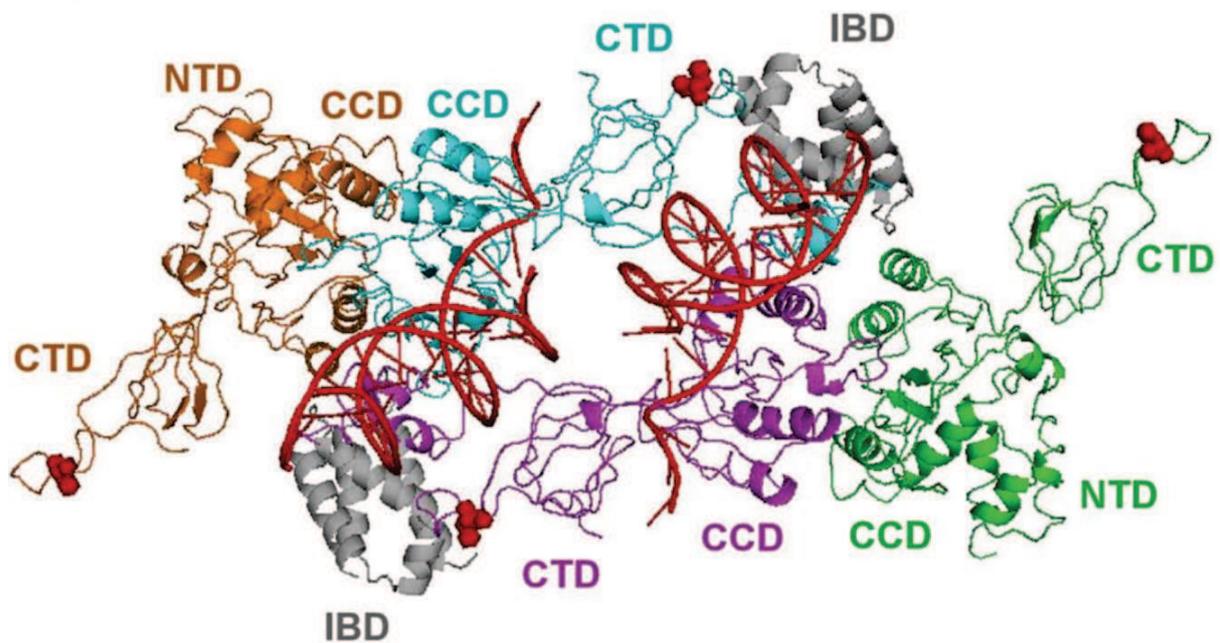


Figure 19 : Modélisation des interactions entre IN, ADN viral et LEDGF.

Le tétramère d'IN formé de dimères de dimère (bleu, orange, violet, vert) lie l'ADN viral via ses sous-unités internes. Le domaine IBD de LEDGF (gris) permet la stabilisation de ce complexe. Les sphères rouges représentent les pharmacophores utilisés dans cette expérimentation de FRET [297].

C - Les inhibiteurs de l'intégrase

Son rôle essentiel dans la réplication virale du VIH-1 et l'absence de fonctions équivalentes dans les cellules humaines font de l'intégrase une cible de choix dans le développement de traitements antirétroviraux.

1. Les inhibiteurs catalytiques de l'IN (INSTIs)

a) *Le mécanisme d'action des INSTIs*

La première classe de molécules capables d'inhiber la réplication du VIH-1 par le blocage de l'IN a été reportée en 2000 [298]. C'est une expérimentation de criblage au niveau des complexes préassemblés d'IN et d'ADN viral qui a permis l'identification de ces composés [299]. Puis une optimisation empirique du pharmacophore originel appartenant aux dikéto-acides a permis la découverte du composé MK0518 plus connu aujourd'hui sous le nom de raltegravir (RAL) [300,301]. Le RAL est la première molécule de la classe des INSTIs (intégrase strand transfer inhibitors) approuvée dans le traitement du SIDA en 2007 [106]. Depuis deux INSTIs supplémentaires sont également utilisés dans les thérapies ART : l'elvitegravir (ELV) et le dolutegravir (DTG) [107,302,303]. La structure chimique de ces trois composés de la classe des INSTIs est représentée dans la figure 20.

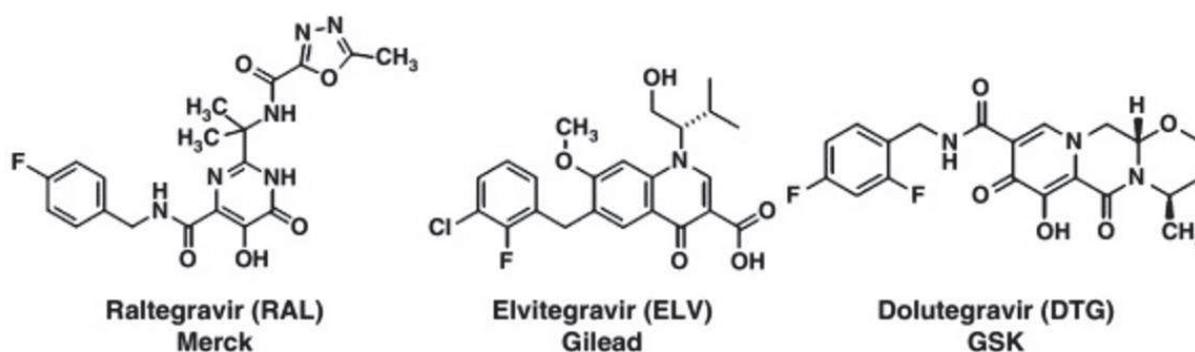


Figure 20 : structures chimiques des INSTIs RAL, EVG et DTG.

Les différentes INSTIs approuvées par la FDA dans les traitements ART ainsi que les sociétés biopharmaceutiques les produisant sont indiqués [304].

Les INSTIs actuellement utilisés en thérapie montrent une bonne tolérance et de faibles effets secondaires chez les patients traités. En plus de leur faible toxicité les traitements contenant des INSTIs sont très efficaces pour supprimer la réplication du VIH-1 *in vivo*, leur utilisation est donc désormais recommandée pour l'initiation de la thérapie chez l'adulte [304].

Conformément à la méthode initiale utilisée pour leur identification, les INSTIs se fixent sur le site actif de l'IN mais uniquement lorsque l'enzyme est complexée à son substrat c'est-à-dire les extrémités LTR de l'ADN viral. Ainsi les INSTIs entrent en compétition pour la fixation sur l'intasome avec l'ADN cellulaire cible [154].

La liaison des INSTIs sur l'intasome est décrite comme forte, avec une demi-vie de dissociation longue allant de plusieurs heures pour le RAL et EVG jusqu'à plusieurs jours pour le DTG [305]. Cette caractéristique est très importante car elle confère aux INSTIs la capacité de bloquer un complexe ayant une longue durée de vie tel que le PIC. Ainsi les INSTIs sont très efficaces car elles restent associées à l'intasome durant l'import nucléaire, l'acheminement vers les séquences d'ADN génomique cibles de l'intégration et jusqu'à la dégradation du complexe PIC par la machinerie cellulaire.

Les inhibiteurs catalytiques de l'intégrase INSTIs possèdent un effet antirétroviral sur la réaction de transfert de brin médiée par l'IN via deux mécanismes d'action. En effet l'ensemble des INSTIs est caractérisé par la présence de deux structures essentielles : un pharmacophore liant le métal permettant de séquestrer le site actif des ions métalliques ainsi qu'un groupe hydrophobe interagissant à la fois avec l'IN et l'ADN viral [306]. Ainsi les INSTIs sont les seuls antirétroviraux utilisés en thérapie ART qui interagissent à ce jour avec deux éléments essentiels pour le virus, l'IN et l'ADN viral, son substrat pour l'étape d'intégration.

Le core de chélation des ions métalliques Mg^{2+} ou Mn^{2+} des INSTIs est généralement formé d'une triade d'atomes d'oxygène attachés par des liaisons rigides. Le domaine d'interaction avec l'intasome est une chaîne latérale aromatique appartenant souvent au groupe des halobenzyles. Le reste de la structure des INSTIs est plus variable en fonction des molécules et leur confère plus ou moins d'efficacité.

Les résidus contenus dans le site actif et ceux aux environs des sites de fixation des INSTIs étant fortement conservés dans la séquence IN ces molécules possèdent un large spectre d'activité contre divers rétrovirus [307,308,309,310]. La cristallisation de la structure de l'intasome du PFV a permis de corroborer les mécanismes biochimiques de ces INSTIs et a

fourni un modèle structurel pour la compréhension de leur activité antirétrovirale [107,154,311].

Il a ainsi pu être mis en évidence que la triade d'hétéroatomes permettant la chélation des ions métalliques se fixe sur le site actif de l'IN afin de mimer les interactions impliquées dans les réactions de 3' processing et de transfert de brin. L'atome d'oxygène central occupe un site normalement dédié à une liaison phosphodiester avec l'ADN viral ou cellulaire. L'atome le plus éloigné du site aromatique mime simultanément l'attaque d'une molécule d'eau lors du 3' processing et la liaison phosphodiester avec l'ADN cible. Enfin le troisième atome d'oxygène remplace l'attaque par le 3'OH libre de l'ADN viral lors du transfert de brin [219]. La chaîne aromatique des INSTIs encombre la position normalement occupée par l'extrémité maturée de l'ADN viral contenant les résidus Pro145 et Gln146 de l'IN du VIH-1 [150]. Les INSTIs semblent capables de créer des interactions avec le résidu Tyr212 de l'IN PFV, correspondant au Tyr143 de l'IN VIH-1. Il s'agit de liaison hydrogène pour le RAL et de liaisons van der Waals pour les EVG et DTG [219].

Fondamentalement, la capacité des INSTIs à engager rapidement les ions métalliques sur l'intasome et à déplacer l'ADN viral du site actif de l'IN rend la seconde réaction d'intégration, le transfert de brin, irréalisable et bloque ainsi la réplication virale.

Les INSTIs inhibent efficacement la réaction de transfert de brin de l'intégration, cependant il a été démontré qu'à de très fortes concentrations ces molécules ont également un effet beaucoup plus faible sur la réaction 3' processing, qui est l'étape antérieure au transfert de brin permettant la maturation des extrémités de l'ADN viral [298]. Le défaut d'activité des INSTIs sur cette réaction peut être expliqué par la grande perte énergétique associée au désengagement de la liaison phosphodiester de l'ADN viral avec les ions Mg^{2+} sur le site actif de l'intasome.

b) Les mutations de résistance aux INSTIs

La relevance clinique de résistance aux antirétroviraux peut être interprétée via des algorithmes génotypiques et peut être informative en amont de la prescription d'un traitement adapté pour des patients porteurs de virus mutants. Cependant l'arrêt du traitement peut résulter à la réversion de populations virales résistantes capables de se répliquer efficacement lors de la ré-initiation du traitement [312,313]. Ainsi l'efficacité de traitements futurs peut être altérée par l'apparition de mutations de résistance lors de l'échec d'une thérapie de première intention. Cela est dû au fait que la pression de sélection associé au

traitement induit simultanément l'émergence et l'archivage rapide des virus résistants aux antirétroviraux [314]. Lors de la réplication active ayant lieu pendant les phases chroniques de l'infection les réservoirs viraux de latence à long terme peuvent être alimentés par ces virus résistants pouvant ensuite être réactivés.

Le traitement optimal basé sur l'utilisation du RAL préconise de le combiner avec deux inhibiteurs de la RT. Plusieurs mutations de résistance ont été identifiées dans les isolats viraux de patients en échec thérapeutique de première intention. Ces mutations sont localisées essentiellement sur IN : L74L/M, V151I, N155H, Y143R et S230R. Mais dans ce contexte thérapeutique, des mutations de résistance sont également observées sur la RT : M184M/I/V et K65K/R. La grande majorité des virus résistants révélés lors de cette étude sont doublement insensibilisés aux inhibiteurs de RT et d'IN. La combinaison des mutations N155H IN avec M184M/I/V RT est la plus fréquemment répertoriée [315]. Des études similaires montrent également que ce traitement basé sur le RAL de patients naïfs en échec thérapeutique induit l'apparition de mutations conférant fréquemment une résistance à plusieurs types d'inhibiteurs de RT et d'IN. Cependant certains virus observent une résistance seulement pour l'une ou l'autre de ces classes d'antirétroviraux. Ainsi de nouvelles mutations de résistance sur l'IN sont décrites : G140S, Q148H/R, E92Q, T97A, [316,317]. Lorsque le RAL est associé à un inhibiteur de PR darunavir (DRV), seule la mutation de résistance N155H IN est observée [318]. L'archivage rapide de virus porteurs de mutation de résistance au RAL dans les réservoirs de latence a également été mis en évidence [319].

L'ensemble des études menées sur le sujet a permis d'identifier trois voies génétiques majeures induisant un échec thérapeutique chez des patients naïfs associé à la résistance au RAL. Il s'agit des substitutions des résidus Y143R/C/H, N155H et Q148H/R de l'IN [320]. Souvent ces substitutions primaires sont associées avec des niveaux moyens de résistance, leurs effets sont largement amplifiés lors de la présence additionnelle de substitutions dites secondaires. La résistance aux INSTIs étant associée à la modification de régions proches du site actif, ces substitutions secondaires sont compensatoires car elles permettent de restaurer la capacité répliquative du virus. C'est le cas des doubles substitutions Y143R/T97A, N155H/E92Q et Q148H/G140S sur l'IN [321].

L'EVG utilisé dans le traitement ART depuis 2012 possédant un problème de biodisponibilité il nécessite d'être combiné avec un inhibiteur de cytochromes hépatiques tel le Cobicistat. Ces inhibiteurs qui augmentent la durée de vie des médicaments sont en fait des inhibiteurs d'enzymes de « détoxification », qui dégradent les molécules chimiques exogènes comme les médicaments. Un autre inhibiteur de ce type, le Ritonavir, est fréquemment associé aux

anti-protéases. L'inconvénient de ce type d'inhibiteur est leur toxicité. l'EVG, ayant l'avantage de pouvoir être administré en un seul comprimé, est également associé à deux inhibiteurs de RT. Néanmoins l'échec thérapeutique suivant l'administration de ce médicament à des patients naïfs est lui aussi corrélé à l'apparition de mutations de résistance contre EVG et les inhibiteurs de RT. Des études cliniques ont permis de mettre en évidence les mutations de résistance : T66I, E92Q, T97A, Q148R et N155H sur l'IN et M184I/V sur la RT [322]. Sur l'ensemble des études, un « overlap » considérable est observé sur les mutations de résistance sur l'IN après un échec thérapeutique suite au traitement basé sur le RAL et l'EVG. Ces observations sont en corrélation le mode d'action identique de l'ensemble de la classe des INSTIs qui ciblent toutes le site actif de l'IN, séquence indispensable à la réplication du VIH-1 et très conservée au sein des rétrovirus. L'existence de ces résistances dites croisées empêche l'utilisation séquentielle des INSTIs dans les thérapies ART.

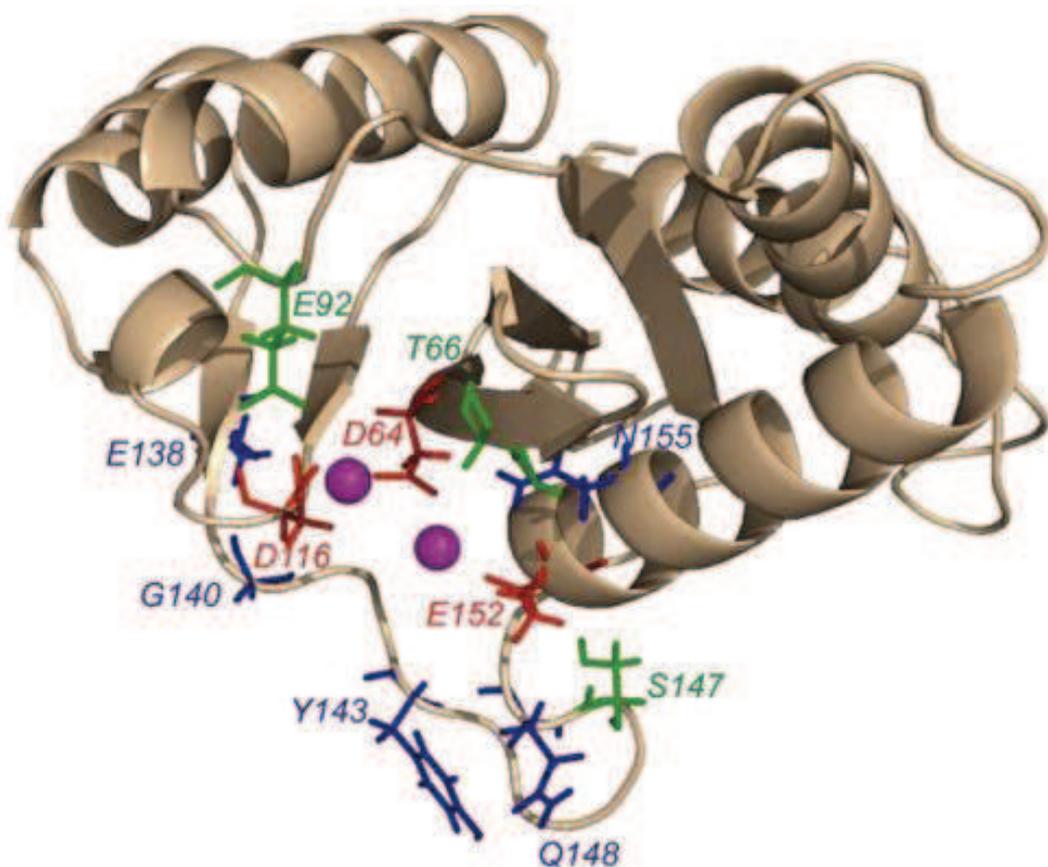


Figure 21 : Localisation sur le domaine CCD IN des résidus impliqués dans la résistance aux inhibiteurs catalytiques RAL et EVG.

La structure d'un dimère de CCD IN comprenant la triade catalytique DDE (rouge) et les ions métalliques (violet) est représentée. Les résidus dont la mutation entraîne une résistance aux INSTIs, RAL (bleu) et EVG (vert) sont également indiqués [323].

La plupart des substitutions conférant une résistance croisée au RAL et à l'EVG sont caractérisées par les mutations primaires (E138, Y143, Q148) et secondaires (G140, Q146 et S147) (figure 21). L'ensemble de ces mutations sont localisées dans le domaine CCD de l'IN, à proximité du site actif, sur des sites impliqués dans l'étape d'intégration. Comme par exemple niveau de la boucle composée des résidus 140 à 149 décrite comme importante pour la fixation de l'ADN et pour la flexibilité nécessaire à l'activité catalytique de l'IN [323].

Enfin le DTG est le dernier composé de la classe des INSTIs à avoir été approuvé dans le traitement ART. Il possède l'avantage de ne pas nécessiter de booster tel que le Cobicistat car il se maintient durablement dans l'organisme. Tout comme les autres INSTIs, il est préconisé de l'utiliser en combinaison de deux inhibiteurs de RT. Cette molécule de seconde génération se différencie des deux autres INSTIs car aucune émergence de mutation de résistance au DTG n'a été rapportée suite à l'utilisation de traitement basé sur DTG chez des patients naïfs [324,325].

Une étude sur la mise en place d'une thérapie de seconde ligne basée sur le DTG chez des patients ayant subi un premier échec thérapeutique sans traitement avec des INSTIS montre que celle-ci est plus efficace en seconde intention que les thérapies incluant le RAL ou l'EVG [326].

Contrairement au RAL et EVG, le traitement combinant le DTG à deux NRTIs n'induit pas de résistance additionnelle à ces inhibiteurs de RT au cours de l'apparition d'un échec thérapeutique [327]. Néanmoins un très faible nombre de patients sous DTG développent une mutation correspondant à la substitution R263K sur l'IN. Cette mutation présentée comme une mutation de résistance au DTG n'induit pourtant *in vitro* aucune résistance au DTG décelable (Le Rouzic communication personnelle). Des études sur plusieurs lignées dont des cellules primaires humaines ont rapporté que la mutation R263K IN induit une diminution de l'affinité de l'IN pour l'ADN perturbant ainsi l'étape d'intégration. Cette mutation a également été corrélée à une diminution de la capacité répliquative et de l'inféctivité du VIH-1 [328,329]. Pour l'instant aucune mutation secondaire compensatoire, nécessaire pour restaurer le défaut de répllication virale induit par la première, n'a été identifiée avec R263K. Ces observations pourraient expliquer le fait que cette mutation, en partie délétère pour le virus, soit associée à un faible niveau de résistance.

Cependant suite à un échec thérapeutique associé aux traitements basés sur RAL ou EVG, la préexistence de mutations de résistance confère une résistance croisée pour l'ensemble des INSTIs, y compris le DTG [330,331,332]. Par exemple la combinaison de substitutions Q148H/R et G140S/A sur l'IN du VIH-1 confère au virus mutant une perte de la susceptibilité croisée au RAL, EVG et DTG [333,334]. Ainsi le DTG reste à ce jour un bon candidat dans

l'utilisation de traitements de première ou de seconde intention, cependant il n'est pas efficace pour des patients étant en échec thérapeutique suite à un premier traitement comprenant une molécule de la classe des INSTIs.

2. Les inhibiteurs allostériques de l'interaction IN-LEDGF (INLAIs)

a) *Une nouvelle classe d'antirétroviraux ciblant l'IN*

L'émergence de virus résistants ou multirésistants chez des patients en échec thérapeutique contre l'ensemble des classes d'antirétroviraux actuellement sur le marché biopharmaceutique démontre la nécessité de développer de nouvelles molécules avec un mécanisme d'action innovant.

Afin de pallier aux résistances aux inhibiteurs INSTIs actuellement utilisés dans les thérapies ART pour cibler l'enzyme virale IN, depuis quelques années plusieurs équipes dont celle de Mutabilis (antérieurement Cellvir) travaillent sur le développement d'une nouvelle classe d'anti-intégrase inhibant des interactions protéine-protéine. Ces inhibiteurs ne ciblent plus le site actif de l'IN mais son interaction avec son cofacteur cellulaire LEDGF/p75.

En effet, compte tenu du rôle majeur de LEDGF/p75 dans l'intégration et la réplication du VIH-1, il y a un fort potentiel thérapeutique dans l'inhibition de cette interaction. Cependant l'identification d'un inhibiteur d'interface protéine-protéine à visée thérapeutique représente encore aujourd'hui un énorme défi. La taille des surfaces de contact allant de 1 500 à 3 000 Å pour une interface protéine-protéine contre 300 à 1 000 Å pour l'interface d'un site enzymatique catalytique avec une petite molécule inhibitrice, ou encore l'environnement de l'interface sont des contraintes majeures pour le développement de petites molécules pharmacologiques ciblant des interactions protéine-protéine [335].

La résolution de la structure de l'interface CCD-CCD de l'IN du PFV [154] amorça le criblage de nouvelles molécules se liant à cette interface. Cela permit l'identification des composés 3,4-dihydroxyphenyltriphenylarsonium bromide capables d'inhiber les réactions 3' processing et de transfert de brin *in vitro* à des concentrations de l'ordre du micromolaire [336]. Des études complémentaires mirent en évidence que ces molécules possèdent également la capacité d'empêcher l'interaction de l'IN avec son substrat ADN viral et modifient l'échange dynamique des sous unités d'IN [337]. Ces études ont permis d'établir une corrélation entre la fixation de petites molécules sur l'interface CCD-CCD de l'IN et une inhibition allostérique de son activité catalytique.

L'identification de l'interaction IN-LEDGF comme cible thérapeutique potentielle débuta suite à des études portant sur des peptides dérivés du domaine IBD de LEDGF/p75. Ces peptides possédant les résidus Ile365 et Asp366, nécessaires à l'interaction avec l'IN, empêchent la fixation de LEDGF sur l'IN et induisent une multimérisation de l'IN en absence de l'ADN viral [296,338]. Ces résultats ont permis de fixer les bases mécanistiques des petites molécules inhibitrices de l'interaction IN-LEDGF développées par la suite.

De ce fait, l'élucidation de la structure de l'interface entre IBD LEDGF-CCD IN a été une étape décisive dans l'élaboration de ce nouveau type d'inhibiteurs [292]. L'interface formée par la dimérisation de l'IN créant une poche hydrophobe dans laquelle les liaisons hydrogènes avec LEDGF peuvent avoir lieu, cette région est idéale pour le design de petites molécules.

Deux approches différentes ont permis la découverte de petites molécules dérivées d'acides acétiques base quinoléine se fixant efficacement sur le site de liaison à LEDGF sur un dimère d'IN. Les laboratoires Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals ont utilisés un criblage à haut débit de molécules antagonistes de l'activité 3' processing *in vitro* afin de sélectionner les acides acétiques tBPQAs (tert-butoxy-(4-phenyl-quinolin-3-yl)-acetic acids) [339]. Une seconde approche basé sur le criblage virtuel de la structure tridimensionnelle cible *in silico* menée par l'équipe de Zeger Debyser a permis l'identification d'un type de molécules très voisines (2-(tert-butoxy)-2- substituted acetic acid derivatives) nommés LEDGINS pour LEDGF/p75-IN inhibitors [340,341].

Au départ il avait été suggéré que ces molécules avaient des mécanismes d'action différents car à l'inverse des tBPQAs, les LEDGINS ne semblaient pas affecter la réaction de 3' processing *in vitro* [340]. Cependant une étude complémentaire a permis de mettre en évidence que des inhibiteurs représentatifs de ces deux groupes de molécules inhibent à la fois l'interaction avec LEDGF et faiblement les réactions 3' processing et de transfert de brin avec des concentrations similaires de l'ordre du micromolaire, bien plus élevées que celles des INSTIs pour l'inhibition du transfert de brin [342]. Ces observations supportent la notion que ces deux types de molécules découvertes indépendamment sont capables d'inhiber la réplication du VIH-1 avec un mécanisme d'action identique.

Cette interaction IN-LEDGF est devenue une cible majeure pour les grandes entreprises pharmaceutiques engagées dans le développement de nouvelle classe d'antirétroviraux. Boehringer Ingelheim fut la première engagée dans le domaine des inhibiteurs d'IN-LEDGF avec le dépôt de plusieurs brevets ensuite licenciés à Gilead qui poursuit les recherches associées à ces antirétroviraux. D'autres sociétés sont également à l'origine tel que GSK, BMS et Shionogi de nombreux brevets dans le domaine. La société biopharmaceutique

Mutabilis, avec laquelle j'ai réalisé ma thèse en partenariat, a également déposé plusieurs brevets dans ce domaine.

La cristallographie de la structure du dimère CCD IN en présence de ces composés révèle que leur fixation sur l'IN a lieu dans la poche de liaison à LEDGF, une région distincte du site actif de l'enzyme. Plusieurs acronymes ont été proposés pour décrire ces molécules et leur nomenclature diffère en fonction des laboratoires, elles sont nommées LEDGINS [340], NCINIs pour Non-Catalytic IN Inhibitors [339,343] ou encore ALLINI pour Allosteric Integrase Inhibitors [279,342,344]. Aucun consensus sur leur nom n'ayant encore été défini, et dans un souci de clarté, nous avons choisi de les regrouper sous l'acronyme d'INLAI pour IN-LEDGF Allosteric Inhibitors dans la suite de mon manuscrit. Cet acronyme a l'avantage de rappeler les deux mécanismes d'action de ces inhibiteurs : inhibition de l'interaction IN-LEDGF et l'inhibition allostérique de l'IN.

b) Le mécanisme d'action des INLAIs

Les INLAIs possèdent deux caractéristiques structurales essentielles à leur activité. Un pharmacophore composé d'un groupement carboxylique capable de mimer le résidu Asp366 de LEDGF et ainsi de créer des liaisons hydrogènes avec les acides aminés Glu170 et His171 de l'IN [339,340,342,344]. Ainsi qu'une chaîne aromatique qui mime l'interaction avec le résidu Ile365 de LEDGF (figure 22).

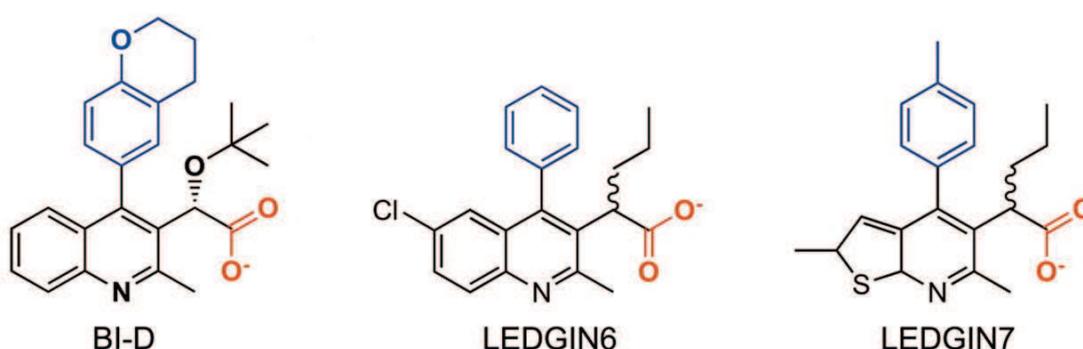


Figure 22 : Structure chimique des INLAIs BI-D, LEDGIN6 et LEDGIN7.

Différents types d'inhibiteurs de l'interaction IN-LEDGF sont représentés : tBPQAs (BI-D) et LEDGINS (LEDGIN6 et LEDGIN7). Les groupements mimant les résidus Asp366 et Ile365 de LEDGF impliqués dans l'interaction avec l'IN sont indiqués respectivement en rouge et en bleu [150].

D'autres caractéristiques de fixation sur le dimère CCD IN des INLAIs dans la poche d'interaction avec LEDGF ont été référencées. Le groupement methoxy ou tert-butoxy reliant l'acide carboxylique au site aromatique quinoléine (respectivement en rouge et bleu sur la figure 22) est retrouvé à proximité des résidus Tyr99, Gln95 et Thr174 de l'IN. Le core quinoléine lui-même se situe proche des résidus Ala128, Thr124 et Thr125 de l'IN constituant l'une des faces de la poche de liaison à LEDGF. Enfin le groupement aromatique fonctionnel attaché à ce core quinoléine établit un contact avec les deux monomères internes de l'IN, il se retrouve à l'interface entre les résidus Leu102, Ala128, Ala129 et Trp131 de la chaîne B et des résidus Thr174, Gln168, Ala169 et Met178 de la chaîne A de l'IN [339,342]. Les zones de contact entre le dimère CCD IN et LEDGF ou BI-D, un inhibiteur de la classe des INLAI, sont représentées sur la figure 23.

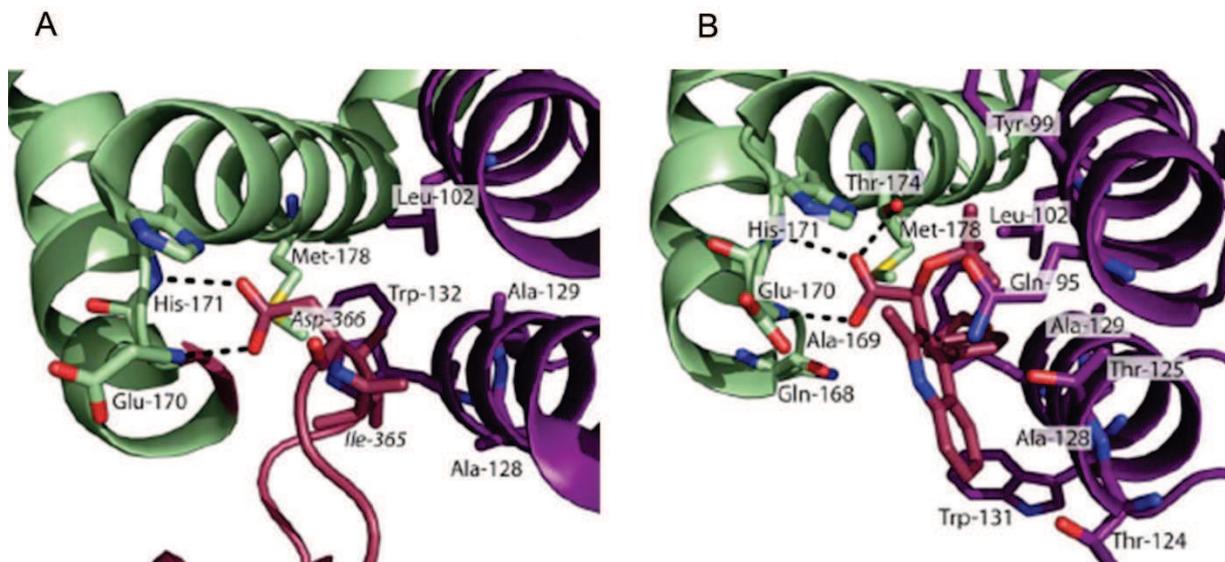


Figure 23 : Comparaison de la liaison du domaine IBD LEDGF ou des INLAIs sur un dimère CCD IN.

Les domaines CCD-CCD IN (vert et violet) sont représentés en présence (A) des résidus du domaine IBD LEDGF impliqués dans l'interaction avec l'IN ou en présence (B) du BI-D. Modifiée à partir de [337]

La fixation des INLAIs sur le site d'interaction entre le domaine IBD de LEDGF sur l'interface du dimère CCD IN induit l'inhibition de cette interaction mais également une diminution des réactions de 3' processing et de transfert de brin médiées par l'IN *in vitro* [339,340,341,342,345]. Cette région étant géographique divergente du site actif de l'enzyme,

les INLAIs possédant la capacité d'inhiber l'activité catalytique de l'IN indépendamment du site de fixation du cofacteur LEDGF sont donc définis comme allostériques.

Il a été démontré que les INLAIs sont capables de se lier à l'interface du dimère CCD-CCD IN, sur le site d'interaction avec LEDGF, possèdent une activité supplémentaire conduisant à la formation de multimères d'IN [346,347,348]. A partir de ces observations le postulat selon lequel les INLAIs pourraient avoir un effet sur la dynamique d'organisation des sous unités d'IN fut proposé [342]. Ainsi il a pu être mis en évidence que les INLAIs induisent l'augmentation de la multimérisation anormale de l'IN en absence d'ADN viral ce qui entraîne l'inhibition de la formation de complexe IN-ADN viral intasome *in vitro* [339,341,342]. Je ne connais aucune manip la dessus ou de résultat probant.

L'ensemble de ces résultats ont permis de mettre en évidence que les INLAIs possèdent un mécanisme d'action allostérique multiple car leur fixation sur l'IN permet l'inhibition de l'interaction IN-LEDGF ainsi que de l'activité catalytique de l'IN mais également l'augmentation de la multimérisation non fonctionnelle de l'IN.

c) *L'action des INLAIs au cours du cycle réplication du VIH-1*

Aujourd'hui les INLAIs les plus efficaces sont capables d'inhiber la réplication du VIH-1 avec une EC50 (concentration nécessaire pour induire 50% d'efficacité) comprise entre 10-100 nanomolaire [339,345,349].

Lorsque j'ai débuté mes travaux de thèse, le mécanisme d'action des INLAIs sur la réplication du VIH-1 n'était pas encore élucidé. Avec d'autres laboratoires, nos travaux publiés en 2013 [350], décrits dans la partie résultats de mon manuscrit, ont participé activement à l'élucidation de ce mécanisme d'action unique de ces inhibiteurs.

Comme cela sera discuté dans la suite de mon manuscrit, avec d'autres laboratoires comme celui de Balakrishnan, nos travaux ont permis de mettre en évidence que les INLAIs initialement développées dans le but d'inhiber l'étape d'intégration possèdent également de manière inattendue une seconde activité antirétrovirale, plus forte, sur les étapes tardives de la réplication du VIH-1 [343,350]. Ces observations ont ensuite été corroborées avec d'autres molécules de la classe des INLAIs [323,331].

Contrairement aux mutants de l'IN de classe I bloquant spécifiquement l'étape d'intégration, les mutants de l'IN de classe II entraînent des perturbations pléiotropiques sur la réplication du VIH-1. Il a notamment été montré qu'un virus porteur de la substitution IN Q168A proche

du site de liaison de LEDGF sur l'IN, possède une activité catalytique de l'IN équivalente au virus sauvage, cependant il présente un défaut au niveau des étapes de transcription inverse, d'assemblage et de bourgeonnement [236,351]. Comme la majorité des mutations de l'IN, y compris celles identifiées sur le site de liaison à LEDGF, induit un phénotype viral de type classe II il a donc été suggéré que l'effet des INLAIs sur les étapes tardives de la réplication du VIH-1 puisse être comparable au phénotype viral pléiotrophique des mutants de l'IN de classe II [292,351].

Le défaut le plus couramment observé avec les mutations de l'IN de classe II concerne l'étape de transcription inverse [187]. Dans les cellules cibles, la présence d'INLAIs lors des étapes précoces de la réplication n'influence pas négativement l'étape de transcription inverse [344]. Au contraire lorsque les INLAIs sont ajoutées dans les cellules productrices, les virions néosynthétisés présentent un défaut de transcription inverse lorsqu'ils sont utilisés pour infecter de nouvelles cellules cibles en absence d'antirétroviraux [343,344,352].

Des études de microscopie électronique des virions produits en présence d'INLAIs ont permis de mettre en évidence une structure virale définie comme excentrique. Le matériel ribonucléoprotéique du virus dense aux électrons « excentrique » est situé hors du core défini par la capsid virale conique, alors que dans les virus normaux ce matériel ribonucléoprotéique est situé à l'intérieur du cône capsidique au centre du virion [91]. Le core formé des protéines virales de capsid (CA) des virions matures contient le complexe RNP (ribonucléoprotéine) composé de l'ARN viral et de protéines de nucléocapsid (NC). Les virions excentriques possèdent donc une structure différente et particulière avec le matériel dense aux électrons correspondant au complexe RNP situé à l'extérieur du core au niveau de la membrane virale (figure 24A). De tels virions excentriques sont également observés lorsque l'IN comporte une mutation de classe II [225,353].

Les virions produits en présence d'un inhibiteur de protéase (ritonavir) empêchant la maturation protéique au sein de la particule virale présentent une structure immature complètement différente de celle induite par les INLAIs. L'utilisation de l'INSTI (RAL) ne modifie pas la morphologie des virions qui sont donc correctement maturés. Au contraire la production de particules virales en présence de l'INLAI (CX05045) induit la synthèse de virions majoritairement excentriques (figure 24B) [352]. Une étude similaire a montré que 90% des particules virales produites en présence du BI-D arborent une structure excentrique [344]. L'effet des INLAIs sur la maturation des virions a été observé par plusieurs laboratoires [343,354].

Malgré le fait que les particules virales produites en présence d'INLAIs possèdent un défaut d'infectivité associé au blocage de la transcription inverse dans de nouvelles cellules cibles,

il a été montré que la maturation protéique, l’empaquetage et la dimérisation de l’ARN viral, la présence d’ARNt ne sont pas modifiés dans des virions synthétisés en présence d’INLAIs [355]. De plus l’activité endogène de la RT in vitro de ces virions n’est pas inhibée par un tel traitement [343,355].

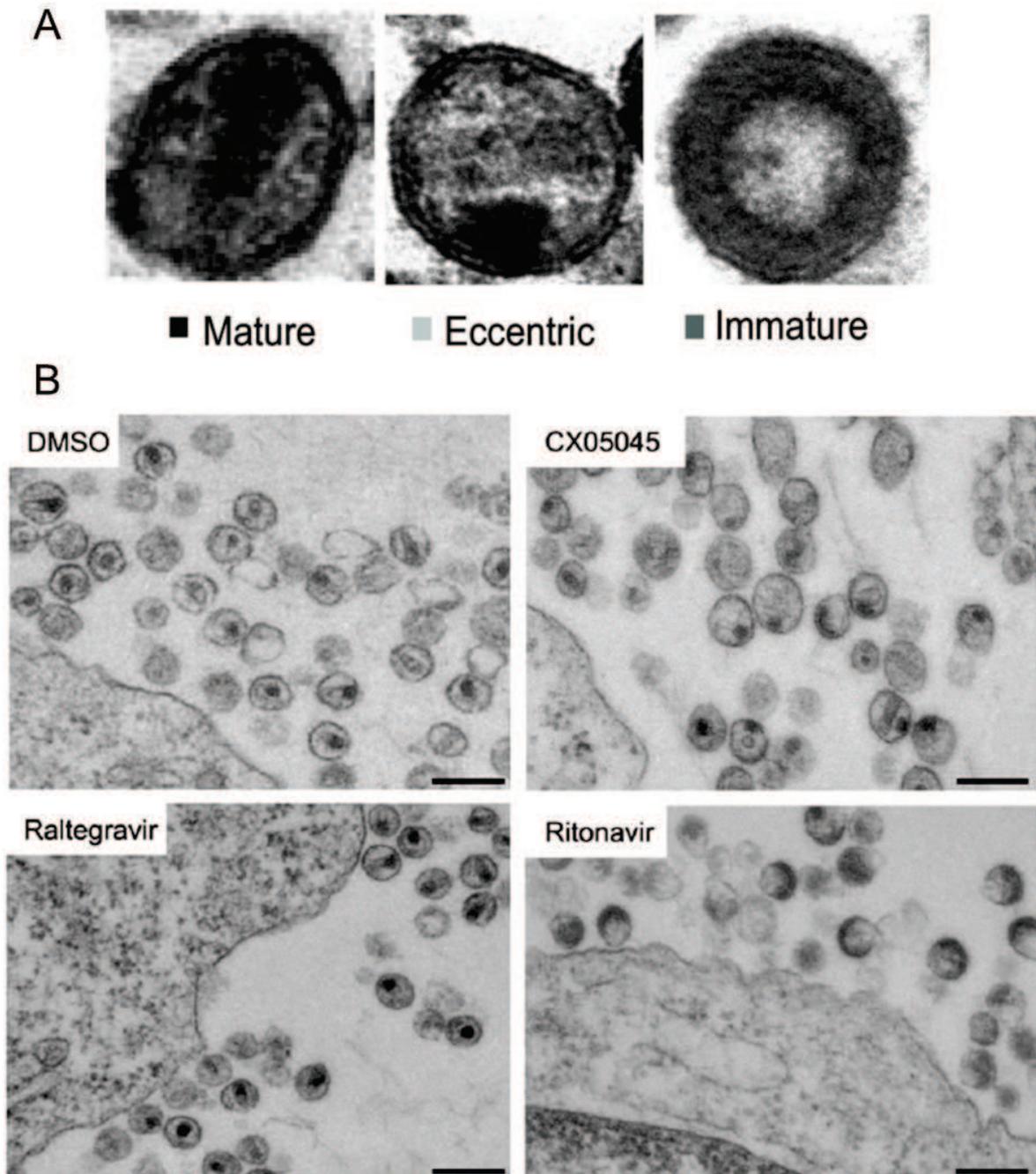


Figure 24 : structure des virions produits en présence de différentes classes d'antirétroviraux. Images en microscopie électronique des particules virales (A) immatures, matures et eccentrices et (B) produites en présence de différentes classes d'antirétroviraux : INLAI (CX05045), INSTI (raltegravir RAL) et PI (ritonavir). Les virions contrôle sont produits en présence de DMSO. Adaptée de [344,352]

La présence d'ARNv ayant été montrée comme nécessaire pour la formation de structure comprenant des complexes RNP eccentrices, il a été suggéré que l'IN possède une fonction supplémentaire lui conférant la capacité d'orchestrer de manière directe ou indirecte l'encapsidation de l'ARN viral dans le core viral [354].

Conformément aux résultats obtenus *in vitro* avec une protéine IN recombinante [195,339,341] il a été montré que les INLAIs sont capables d'augmenter la multimérisation de l'IN à l'intérieur des virions [343,344,352]. Bien que la forme d'oligomérisation fonctionnelle de l'IN au sein du virion ne soit pas encore connue, les INLAIs induisent une multimerisation aberrante de l'IN qui semble affecter la maturation normale des particules. En effet l'apparition d'agrégats d'IN pourrait empêcher certaines interactions IN-protéine ou l'interaction IN-ARN viral génomique jouant un rôle dans la morphogénèse virale.

La capacité des INLAIs d'induire une oligomérisation non fonctionnelle de l'IN leur permet donc d'inhiber efficacement les étapes tardives de la réplication du VIH-1. Néanmoins l'activité de ces molécules sur les étapes précoces, au niveau de l'intégration, est beaucoup moins efficace.

Les travaux développés par Mutabilis dans la publication Le Rouzic et al. présentée dans ma partie résultats portent également sur l'élucidation du double mécanisme d'action des INLAIs, plus faible sur les étapes précoces de la réplication. Ils ont été les premiers à proposer un modèle de compétition de LEDGF avec les INLAIs lors de l'étape d'intégration [350]. D'autres études réalisées dans des cellules n'exprimant plus LEDGF montrent une forte augmentation de l'activité des INLAIs et suggèrent également que la présence du cofacteur pourrait entrer en compétition avec les INLAIs pour la fixation sur le dimère CCD IN [279,344,345,356]. Au contraire la déplétion ou la surexpression de LEDGF n'influence pas l'activité des INLAIs sur les étapes tardives de la réplication [343,344,345,357]. Etant donné que LEDGF est une protéine cellulaire liée à la chromatine de manière constitutive [273], sa présence dans le noyau pourrait être une des causes de l'atténuation de l'effet antirétroviral des INLAIs lors des étapes précoces de la réplication du VIH-1.

Une étude récente a mis en évidence que la fixation sur le dimère CCD IN de LEDGF ou de l'INLAI BI-D induit un modèle différent d'oligomérisation de l'IN. LEDGF stabilise l'IN sous forme de tétramère via une interaction additionnelle avec le domaine NTD IN, alors que le BI-D augmente l'interaction CTD-CTD IN conduisant à une multimérisation aberrante. De plus LEDGF ayant une meilleure affinité que les INLAIs pour son site de fixation sur l'IN, le cofacteur cellulaire peut agir comme un compétiteur du BI-D en empêchant ou en inversant l'oligomérisation anormale de l'IN induite par ces antirétroviraux [358]. Ainsi ces résultats

pourraient expliquer la diminution de l'activité antirétrovirale des INLAIs lors de l'intégration se déroulant dans le noyau, donc en présence du compétiteur LEDGF.

d) Les perspectives thérapeutiques

Les INLAIs sont une nouvelle classe d'antirétroviraux ciblant l'intégrase ayant un mécanisme d'action multimodal inédit permettant l'inhibition à la fois des étapes précoces et tardives de la réplication du VIH-1. De manière surprenante, leur activité antirétrovirale la plus efficace modifie une étape post-intégration impliquée dans la morphogénèse virale et induit la production de virions eccentrices non infectieux. Certaines de ces molécules sont récemment entrées en études cliniques.

Malheureusement des expérimentations *ex vivo* de passages du virus en série sous pression de sélection en présence d'INLAIs montrent l'apparition de mutations de résistance à ce nouveau genre d'antirétroviraux [339,340,341,345,359]. La majorité de ces mutations de résistance aux INLAIs regroupe les résidus Y99H, L102F, A128T, H171T, T174I de l'IN. Ces acides aminés avaient été identifiés comme participant au site de liaison des INLAIs sur la structure du dimère CCD-CCD IN ce qui confirme ce modèle d'interaction (figure 23).

La mutation A128T de l'IN confère une résistance à la majorité des INLAIs référencés à ce jour, son effet sur l'activité de ces inhibiteurs a donc fait l'objet de plusieurs études. Elle n'affecte pas la formation des liaisons hydrogènes des INLAIs sur l'IN mimant la fixation de LEDGF néanmoins elle altère le positionnement de l'inhibiteur sur le dimère CCD IN. Par conséquent la mutation A128T n'induit qu'une modification minimale de l'inhibition de l'interaction IN-LEDGF cependant elle empêche efficacement l'oligomérisation non fonctionnelle de l'IN [360]. La caractérisation de la mutation de résistance A128T a été un des outils utilisés pour mettre en évidence que l'activité inhibitrice des INLAIs sur les étapes tardives de la réplication du VIH-1 est associée à la multimérisation non fonctionnelle de l'IN. En fait les virus porteurs de cette mutation A128T, ne modifiant que la capacité des INLAIs à induire une oligomérisation de l'IN, ne sont plus sensibles à l'activité antirétrovirale des INLAIs [345,352].

Malgré le fait que les INLAIs possèdent une faible barrière génétique, les mutations de résistance apparaissent leur site de fixation sur l'IN correspondant à la poche de liaison naturelle de son cofacteur cellulaire LEDGF. Celui-ci étant différent du site actif de l'enzyme ciblé par les inhibiteurs catalytiques de l'IN, les INLAIs possèdent une activité antirétrovirale lors de l'infection par des virus porteurs de mutations aux INSTIs [340,341,359]. De plus il a

été démontré que la combinaison de ces deux types d'inhibiteurs ciblant l'intégrase n'induit pas d'effet antagoniste mais permet une activité antirétrovirale additive sur la réplication du VIH-1 [341,359].

Contrairement aux protéines virales présentant une grande variabilité du fait de l'apparition de mutations lors de la réplication, les cofacteurs cellulaires du virus possèdent une forte stabilité. Ainsi l'utilisation d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine tel que les INLAIs pourrait être une alternative lors de l'émergence de virus résistants aux INSTIs en augmentant la barrière génétique des mutations virales. Néanmoins la caractérisation du mécanisme d'action de ces antirétroviraux ainsi qu'une grande spécificité afin de ne pas modifier les fonctions cellulaires associées à ces cofacteurs sont nécessaires en vue d'une potentielle application thérapeutique.

Au vue de l'efficacité de la capacité des INLAIs d'induire une multimérisation de l'IN dans les virions, supérieure à son activité d'inhibition de l'interaction IN-LEDGF, de nouvelles molécules bases pyridine MINIs (multimeric IN inhibitors) exploitant exclusivement cette multimérisation non fonctionnelle de l'IN sont actuellement en cours de développement [345].

IV - Un modèle simien pour l'étude du VIH-1

A - Le virus de l'immunodéficience simienne (SIV)

1. La zoonose : transmission du singe à l'Homme

Depuis que le VIH-1 a été découvert, les raisons de son émergence, sa propagation épidémique et sa pathogénicité unique ont été un sujet de recherche important.

La majorité des pathologies infectieuses émergentes ont une origine de zoonose et plus de 70% d'entre elles proviennent du monde sauvage. Plusieurs virus de primates non humains comme le SIV (simian immunodeficiency virus) et le STLV (T-cell lymphotropic virus) ont passé la barrière d'espèces et cette transmission inter-espèce a conduit à aux épidémies associées aux virus VIH et HTLV chez l'Homme. Les causes les plus plausibles de cette transmission inter-espèce entre les primates non humains et l'Homme serait l'exposition aux virus simiens lors de la chasse et la préparation de gibiers et donc au sang et tissus contaminés. Les morsures d'animaux domestiques pourraient également être une source de transmission par exposition au sang contaminé [361,362].

Rapidement après l'identification du VIH comme agent causant du SIDA en 1983, le premier lentivirus simien SIVmac fut isolé l'année suivante à partir de macaques rhésus captifs (*Macaca mulatta*) ayant des symptômes similaires à ceux observés chez l'Homme suite au SIDA [363,364]. Comme le SIVmac induit une pathologie chez les macaques rhésus similaire au SIDA humain, une origine simienne du VIH a été suspectée.

La diversité génétique des lentivirus de primates non humains est complexe et inclus des exemples de coévolution entre le virus et l'hôte, de transmission inter-espèce ainsi que de recombinaison entre différentes lignées SIV. De manière surprenante les virus SIV sont dans la majorité des cas non pathogènes dans leurs hôtes naturels [365]. Ce qui est la preuve que l'émergence du SIDA chez l'Homme et les macaques est la conséquence d'infections inter-espèces avec des lentivirus provenant d'autres espèces de primates. En effet beaucoup de primates non humains sont en réalité infectés conjointement par plusieurs lignées différentes de SIV. Il a notamment été montré que le SIVmac n'est pas naturellement pathogène pour les primates d'Asie macaques mais qu'il a été généré par l'inoculation de sang de primates africains sooty mangabeys naturellement infectés [366,367]. Ce qui permis rapidement de mettre en évidence que les macaques n'étaient pas les hôtes naturels du SIV mais que celui-ci dérivait du virus SIVsmm de sooty mangabey, espèce naturellement infectée par ce virus [366,368].

Des études phylogénétiques ont montré que les virus SIVcpz (chimpanzés) et SIVgor (gorilles) sont les plus proches du VIH-1. Alors que le VIH-2 est plus proche du virus de sooty mangabey. Ces observations suggèrent que ces espèces de primates non humains sont respectivement à l'origine du VIH-1 et VIH-2. Ces études montrent que les virus SIV de chimpanzés et gorilles ont subi au moins 4 événements indépendants de saut de barrière d'espèce pour donner les groupes M, N, O et P du VIH-1 chez l'Homme [361,365]. Les différents groupes du VIH-2 quant à eux sont le résultat d'au moins 9 transmissions distinctes de SIVsmm.

L'ensemble des événements de transmission inter-espèce ayant abouti à l'émergence des virus VIH-1 et VIH-2 chez l'Homme est représenté dans la figure 25.

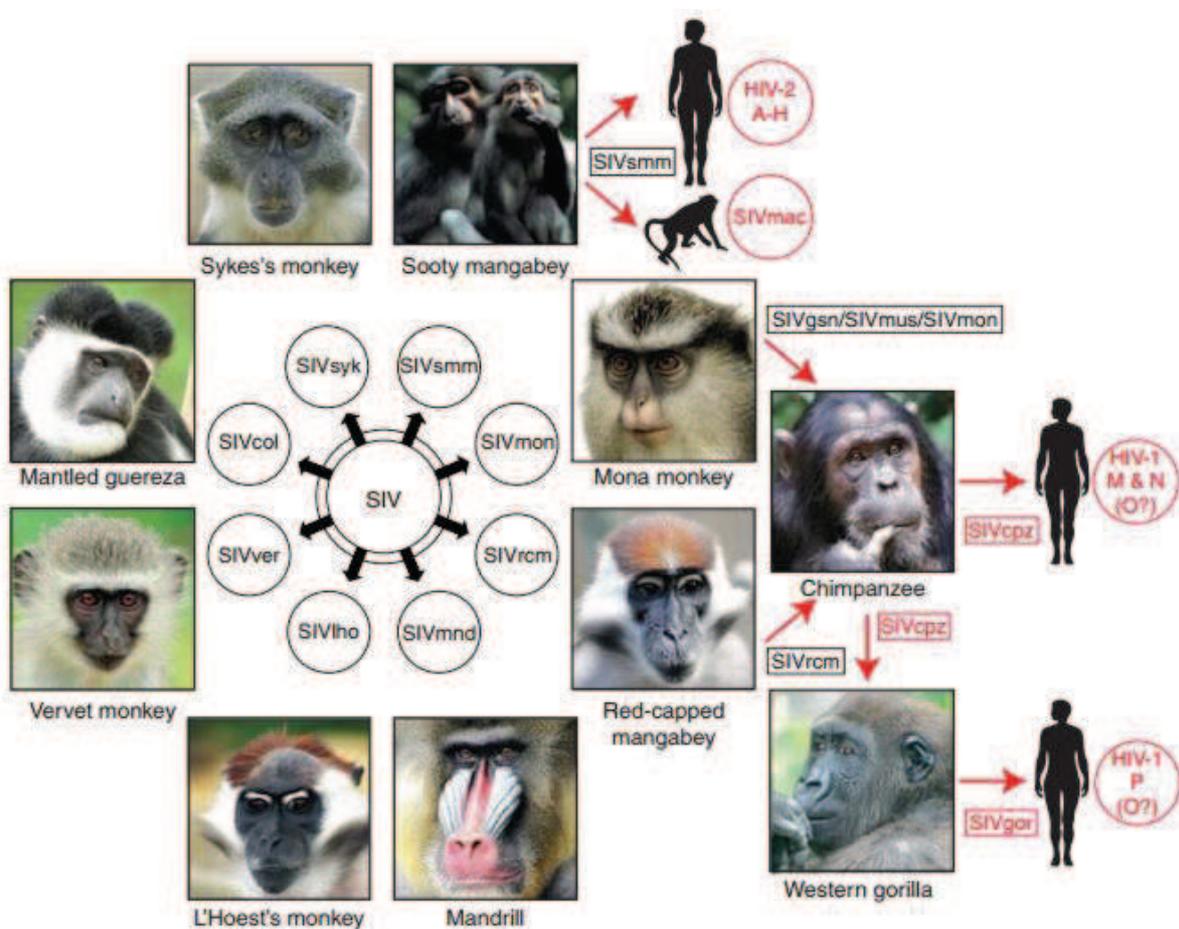


Figure 25 : Origines des virus VIH-1 et VIH-2.

Les singes de l'ancien monde sont naturellement infectés par plus de 40 lentivirus différents appelés virus de l'immunodéficience simienne (SIV). Plusieurs de ces SIV ont franchi la barrière d'espèce et sont à l'origine de nouveaux pathogènes humains VIH-1 et VIH-2. Ces événements de transmission inter-espèce sont indiqués en rouge [365].

2. Origines et réservoirs simiens du VIH

La première souche de SIVcpz a été identifiée au Gabon [369]. Des études ont ensuite été menées sur des chimpanzés captifs provenant de différentes régions du monde et ont montré un fort degré de diversité génétique entre les différentes souches de SIVcpz et les différentes sous espèces de chimpanzés [370]. Le SIVcpz a été retrouvé sur des sites différents mais essentiellement dans une zone entre le Cameroun et la Tanzanie. Seulement 2 des 4 sous espèces de chimpanzés sont infectées par le SIVcpz. L'absence du SIVcpz dans toutes les sous espèces de chimpanzés montre que ces primates ont acquis le virus plus récemment, c'est-à-dire après la divergence en plusieurs sous espèces. Le SIVcpz représente donc une mosaïque complexe car il a été généré de la recombinaison de deux lignées SIVs infectant les singes [371].

Il est maintenant bien établi que toutes les souches SIVcpz d'origine naturelle sont de lignées spécifiques de deux sous espèces de centre Afrique : SIVcpzPtt (chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes*) et SIVcpzPts (chimpanzés *Pan troglodytes schweinfurthii*). Les virus de ces deux lignées sont assez divergents, différents de 30-50% dans leurs séquences protéiques Gag, Pol, Env [372] mais sont les plus proches des souches VIH-1. Grâce à des études phylogéographiques, les réservoirs des ancêtres des virus VIH-1 des groupes M et N ont pu être identifiés dans une communauté de chimpanzés au Cameroun [373,374,375]. Bien que les deux sous espèces de chimpanzés Ptt et Pts sont des réservoirs, seule la souche de virus SIVcpzPtt a été transmise à l'Homme.

Le SIVgor semble être apparu par infection inter-espèce à partir de chimpanzés sympatriques. Des études phylogénétiques ont confirmées cette conclusion indiquant que le SIVgor résulte d'une unique transmission inter-espèce entre chimpanzé et gorille [376]. Le SIVgor apparaît comme moins commun chez les gorilles que le SIVcpz chez les chimpanzés [377]. Ainsi en comparaison avec le SIVcpz, le SIV gor est moins répandu et possède une prévalence moins importante cependant les gorilles ont également transmis leurs SIV à l'Homme. En 2006, une infection SIV a été décrite pour la première fois chez des Gorilles (*gorilla gorilla gorilla*) au sud du Cameroun [378]. Le groupe monophylétique SIVgor est plus proche des groupes P et O du VIH-1 [377,378]. Les souches présentent dans une population de gorilles du sud du Cameroun ont été identifiées comme porteuses d'un virus proche du VIH-1 de type P. Une étude récente a permis de mettre en évidence que le groupe O est apparu quant à lui suite à une transmission inter-espèce de gorilles des plaines de l'Ouest [379].

Le VIH-2 est plus proche du SIVsmm qui infecte les sooty mangabey en Afrique de l'Est. Au moins 9 événements de transmission inter-espèce ont été observés, à l'origine des 9 sous types. Aujourd'hui la prévalence du VIH-2 est en diminution et le VIH-1 devient prédominant en Afrique de l'Est-ce qui s'explique beaucoup car le VIH-2 est moins transmissible et moins pathogénique [380]. Une double infection VIH-1/VIH-2 est souvent observée dans les zones géographiques où les deux virus ont co-circulé mais aujourd'hui il n'y a pas de recombinant VIH-1/2 référencé.

3. La répartition des différents groupes du VIH-1

Les quatre groupes VIH-1 proviennent des chimpanzés et Gorilles d'Afrique centrale de l'Est et la diversité génétique initiale du VIH-1 est associée à différentes introductions de SIVs chez l'Homme. Seul le VIH-1 du groupe M est répandu sur l'ensemble de la planète. Les autres groupes sont moins prévalents. Les aires géographiques des groupes O, N et P du VIH-1 correspondent aux zones où leurs SIV ancestraux ont été identifiés [381]. Tous les virus VIH-1 de ces groupes sont capables de causer une déplétion de lymphocytes T CD4+ et le SIDA, bien que leur distribution mondiale est très différente. La diversité initiale du VIH-1 est associée aux différents événements de transmission inter-espèce. La diversité actuelle au sein du groupe M est le résultat d'évolutions subséquentes et de la propagation dans les populations humaines.

Il a été démontré par biopsies que le VIH-1 de groupe M était déjà présent au Kinshasa (république démocratique du Congo) 20 ans avant les premiers cas de SIDA aux Etats-Unis. Des analyses moléculaires ont montré que le groupe M du VIH-1 a commencé à diverger dans la population humaine au début du vingtième siècle vers 1908 (intervalle confidentiel 1884-1924) [382]. La République démocratique du Congo est considérée comme l'épicentre d'où la diversification initiale des souches du VIH-1 de groupe M a eu lieu et d'où les différents variants M du VIH-1 ont commencé à se répandre dans le reste de l'Afrique puis sur les autres continents [140]. Sur la base d'analyses phylogénétiques, le groupe M du VIH-1 a été subdivisé en 9 sous types (A-D, F-H, J, K). Le sous type C est prédominant dans l'épidémie globale actuelle, il représente plus de la moitié des infections au VIH-1.

Des analyses moléculaires ont daté l'émergence des groupes M et O au début du 20^{ème} siècle [383,384]. En revanche les groupes N et P semblent avoir émergés plus récemment mais les données de séquences de ces groupes rares sont encore trop limitées pour en tirer des conclusions définitives.

Suite à l'augmentation de la mobilité et de la migration humaine, de nouveaux variants de VIH-1 ont été introduit et se sont mélangées interchangeables avec les souches préexistantes dans différentes parties du monde. La géographie des différentes souches de VIH-1 est donc un phénomène dynamique.

B - Immunopatogénicité de l'infection SIV

1. Histoire naturelle de l'infection SIV

Les chimpanzés sont connus pour se battre et tuer d'autres animaux, y compris des singes ce qui suggère qu'ils auraient pu acquérir le SIV dans ce contexte de prédation. Les analyses épidémiologiques liées à l'infection ont révélé que la propagation du SIVcpz provient à l'origine d'une transmission sexuelle avec une probabilité de transmission similaire à celle du VIH-1 chez l'Homme [385,386]. En effet le SIVcpz apparaît aussi comme transmissible de la mère à l'enfant et dans de rares cas par agression [387]. La migration des femelles infectées constitue une route majeure de la transmission de virus entre les communautés [386].

Initialement le SIVcpz semblait être inoffensif pour son hôte naturel. En effet aucun des primates captifs naturellement infectés par le SIVcpz ne souffraient d'immunodéficience. Bien que rétrospectivement ces études ont été menées sur un seul chimpanzé infecté [388]. En plus de cela, les sooty mangabeys ne montraient pas de signe de maladies malgré une grande charge virale détectée dans le sang et les tissus lymphatiques [389]. Ce qui permit de faire l'hypothèse que les SIVs étaient non pathogènes. Depuis de nombreuses études ont été menées en Tanzanie afin d'étudier des chimpanzés naturellement infectés dans leur milieu naturel. Les femelles infectées sont également moins fertiles et ont un plus fort taux de mortalité infantile. Des études post mortem ont mis en évidence une déplétion importante de cellules CD4+ chez certains animaux infectés [365]. Ces résultats montrent que contrairement à ce qui était suggéré dans les premières études sur le sujet, le SIVcpz peut être pathologique pour ses hôtes naturels. Il semblerait donc que le SIVcpz ait un impact négatif sur la santé, la reproduction et sur la durée de vie des chimpanzés porteurs du virus à l'état sauvage.

Il n'a pas encore été déterminé si le SIVgor est pathogénique pour son hôte, car l'histoire naturelle de l'infection de ces animaux en milieu sauvage n'a pas encore pu être étudiée. Le

mode de transmission par lequel les gorilles ont été infectés par le SIVgor reste encore un mystère car ce sont des herbivores, ils ne chassent donc pas d'animaux.

La pathogénicité des infections VIH-1 et VIH-2 se distingue des infections SIV non pathogéniques par un haut niveau d'activation immunitaire chronique qui est un fort prédictif de la progression de la maladie. Il a donc été suggéré que les lentivirus de primates ont induit un milieu inflammatoire pour augmenter leur capacité à se répliquer et accumuler des mutations nécessaires pour leur adaptation [390]. Si tel est le cas, le SIDA pourrait être une conséquence directe/inévitable de la transmission inter-espèce du SIV.

2. Un modèle adapté pour l'infection VIH chez l'Homme

Les modèles d'infection par SIV ou SHIV (Simian/Human immunodeficiency virus) de primates non humains représentent le modèle animal le plus biologiquement pertinent et le plus largement utilisé pour étudier l'infection par le VIH et le SIDA dans son ensemble. Il existe deux types d'infection SIV/SHIV basiques : l'infection pathogène, non naturelle car expérimentale, des hôtes macaques asiatiques et l'infection non pathogène des hôtes naturels africains comme les sooty mangabeys et les singes verts d'Afrique.

L'infection expérimentale de macaques par le SIV résulte en une pathologie caractérisée par un haut niveau de réplication virale, la déplétion progressive de cellules T CD4+, l'activation immunitaire chronique et l'établissement d'immunodéficience muqueuse et systémique. L'ensemble de ces symptômes ressemblent de très près à ceux observés lors du développement du SIDA chez l'Homme [391]. Pour cette raison, l'infection pathogène de macaques par le SIV a été utilisée comme modèle dans de nombreuses études de la transmission, la pathogénicité, la prévention et la thérapie de l'infection VIH, ce qui a eu une très grande influence dans l'avancée de ces divers domaines.

En revanche, l'infection SIV dans les hôtes naturels est généralement non pathogène malgré une réplication virale robuste. Les résultats de ces expérimentations montrent que ce type d'infection aboutit à une conservation des fonctions associées au système immunitaire, sans activation chronique de l'inflammation avec une durée de vie similaire à celle des macaques non infectés [389,392]. Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont porté sur les facteurs associés à la nature bénigne de l'infection SIV naturelle comme par exemple l'absence d'activation chronique de l'inflammation, la diminution du nombre de cellules CD4 mémoires infectées ainsi que la conservation ou la régénération du système immunitaire.

Les principaux mécanismes immunitaires induits au cours de l'infection VIH-1 ou dans des modèles d'infection SIV pathogène ou non pathogène sont synthétisés dans la figure 26.

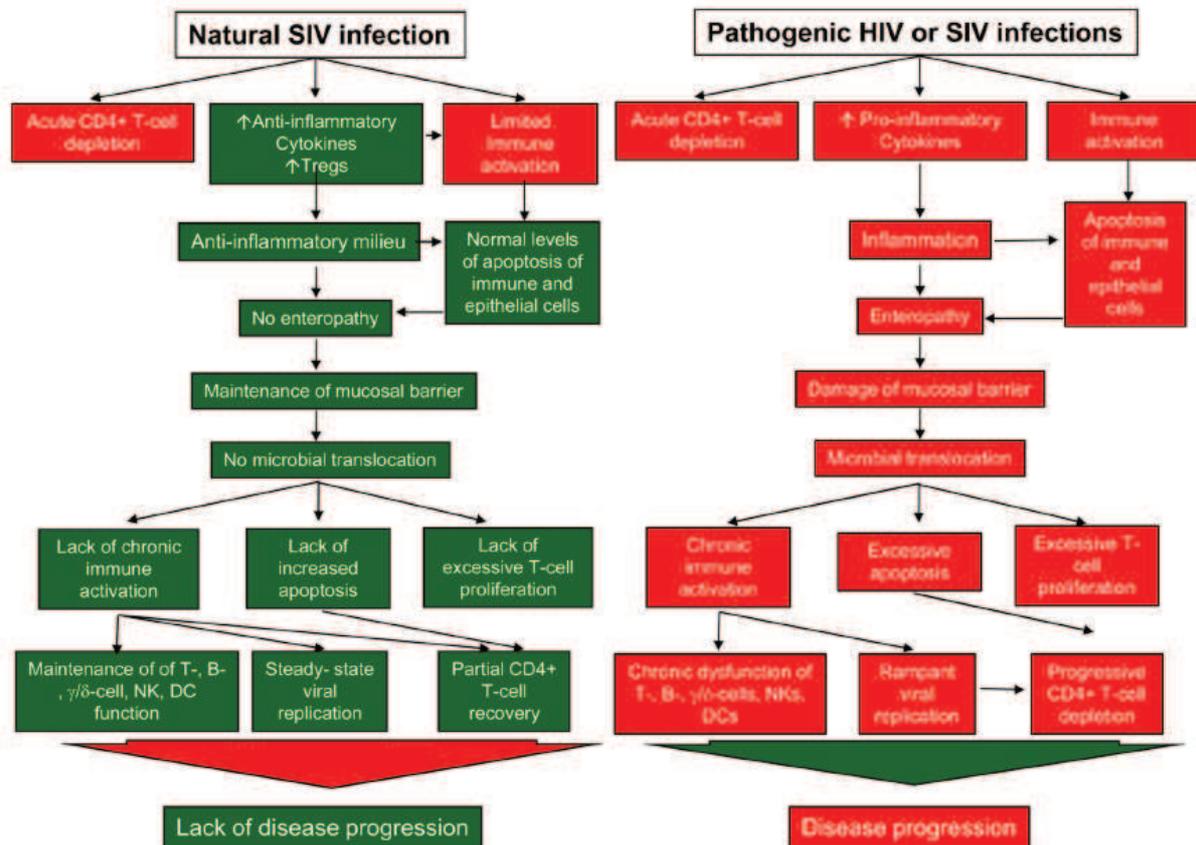


Figure 26 : Comparaison des événements associés à l'infection SIV naturelle ou à l'infection expérimentale pathogène SIV similaire à celle du VIH.

Les différences de réponse immunitaire de l'hôte sont responsables de l'issue de l'infection. Une réponse « équilibrée » permet de stopper la majorité des facteurs engendrant des conséquences néfastes pour l'hôte (côté gauche). A l'inverse, lorsque les réponses immunitaires sont excessives la résultante de l'infection est pathogène pour son hôte (côté droit). Les événements bénéfiques (vert) ou néfastes (rouge) pour l'organisme de l'hôte sont indiqués [393].

Il est important de noter que les chimpanzés font exception à la règle selon laquelle les infections SIV naturelles sont non pathogènes pour leur hôte car l'infection SIV des chimpanzés peut évoluer vers un stade SIDA. Cependant l'infection naturelle des chimpanzés est encore peu étudiée et il semblerait que l'évolution de la maladie vers le stade SIDA chez ces hôtes naturels soit relativement moins fréquente que ce qui est observé chez les macaques ou chez l'Homme [387].

La réponse immunitaire de l'hôte peut être divisée en deux grands modes de défense: la réponse innée qui orchestre les cellules appartenant au second type de réponse plus spécifique nommée adaptative. Ces mécanismes sont interdépendantes et leurs actions sont coordonnées spatialement et temporellement afin d'induire une réponse optimale face à un pathogène donné. Lors de l'infection VIH-1 les réponses immunes et adaptatives de l'hôte sont perturbées. La mise sous traitement ART permet la restauration du système immunitaire mais à des degrés variables selon les individus notamment en fonction du stade d'infection auquel les individus infectés sont traités. Dû au fait que les patients traités sont rarement diagnostiqués au cours de la phase aiguë de l'infection, c'est-à-dire au moment où l'inflammation et la réponse immunitaire innée se mettent en place, peu d'informations sont disponibles à ce jour sur l'impact des ART sur la réponse immunitaire innée. Dans ce contexte, l'étude des infections SIV de primates non humains représente également un modèle de choix pour l'analyse des premières étapes de l'infection [394].

L'infection expérimentale SIV de macaques, induisant le même spectre de troubles immunitaires que ceux observés chez l'Homme suite à l'infection VIH-1, est un modèle qui permet d'accroître considérablement les connaissances sur la réponse immunitaire associée à l'infection VIH, en présence ou non de traitement ART, notamment sur la mise en place de réservoirs viraux ainsi que sur l'inflammation chronique induite dans les tissus gastro-intestinaux ou lymphoïdes [395,396,397,398].

La différence majeure entre les individus pour lesquels l'infection progresse ou non au stage SIDA est l'activation de l'inflammation de longue durée. L'inflammation est initiée par les cellules sensibles du virus qui par la suite activent les cellules de la réponse immunitaire adaptative contribuant au maintien d'une inflammation chronique. Le phénomène d'inflammation est abolit lors de la fin de l'infection aiguë dans les hôtes naturels du SIV permettant ainsi le maintien de l'intégrité des tissus lymphoïdes secondaires qui sont progressivement altérés lors d'une infection VIH. La préservation de l'architecture de ces tissus pourrait participer à une meilleure orchestration de la réponse immunitaire mise en place dans les hôtes naturels du SIV lors d'une infection [394]. Des études sur les hôtes naturels du SIV ont donc permis de mettre en évidence que le contrôle précoce de l'infection est crucial pour stopper rapidement l'inflammation liée à l'infection. En effet certains patients traités précocement avec la thérapie ART semble pouvoir contrôler la réplication virale après l'arrêt du traitement [399].

C - Un modèle d'étude des inhibiteurs d'intégrase

1. Généralités SIV

L'ensemble des rétrovirus contiennent les gènes viraux *gag*, *pol* et *env*. Parmi les lentivirus, le VIH et le SIV sont particuliers car leur génome contient le plus grand nombre de gènes codant pour des protéines régulatrices et auxiliaires : *tat*, *rev*, *Vif*, *Nef*, *Vpu*, *Vpr* ou *vpx*.

Une analyse de la structure du génome viral du VIH-1 et du SIV a permis de mettre en évidence que malgré le fait que seulement 50% de similitudes est observé entre les séquences nucléotides des génomes VIH-1 et SIV, la structure *gag-pro-pol* est conservée ainsi que les éléments essentiels de polyadénylation, d'épissage de l'ADN viral où permettant la fixation du régulateur *rev* [400]. Ces observations semblent montrer que les séquences fonctionnelles du génome viral sont conservées entre les virus VIH-1 et SIV. D'autres études ont également montré des similitudes reconnaissables au niveau protéique entre les virus VIH et SIV notamment de la protéine régulatrice *tat* et des protéines auxiliaires *Nef* et *Vif*, ainsi qu'au niveau de leurs protéines d'enveloppe. De plus il a été mis en évidence que l'infection SIV est également capable de produire des virions maturés après leur bourgeonnement tout comme le VIH [401]. Leur capacité antigénique a également été décrite comme comparable.

Le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) a donc été reporté comme génétiquement, morphologiquement et antigéniquement similaire au VIH. Grâce à l'ensemble de ces caractéristiques, le virus SIVmac représente donc modèle très utile d'étude de l'infection VIH y compris au niveau moléculaire.

2. La comparaison des IN VIH-1 et SIV

Les IN du VIH-2 et du SIV possèdent la même architecture que celle du VIH-1. C'est-à-dire qu'elles sont également composées des trois domaines distincts : le N-terminal NTD, le domaine central CCD contenant le site actif D_{64} , D_{116} , E_{152} , et le C-terminal CTD.

Les séquences codant pour l'intégrase sont très conservées au sein des lentivirus de primates. L'IN du VIH-1 NL4-3 possède ~ 57% d'identité de séquence aussi bien avec l'IN du VIH-2 Rod que celle du SIVmac 239 (figure 27A). Le domaine le plus conservé entre les IN VIH-1 et SIV est le CCD avec 60% d'identité de séquence. Les domaines NTD et CTD sont un peu moins conservés, avec respectivement 56 et 52% d'identité de séquence.

En corrélation avec les analyses phylogénétiques, l'IN du VIH-2 Rod est plus proche de celle du SIVmac 239 avec 84% d'identité de séquence (figure 27B). Tout comme pour le VIH-1, la région la plus conservée entre les IN du SIV et du VIH-2 est le domaine CCD avec 91% d'identité de séquence.

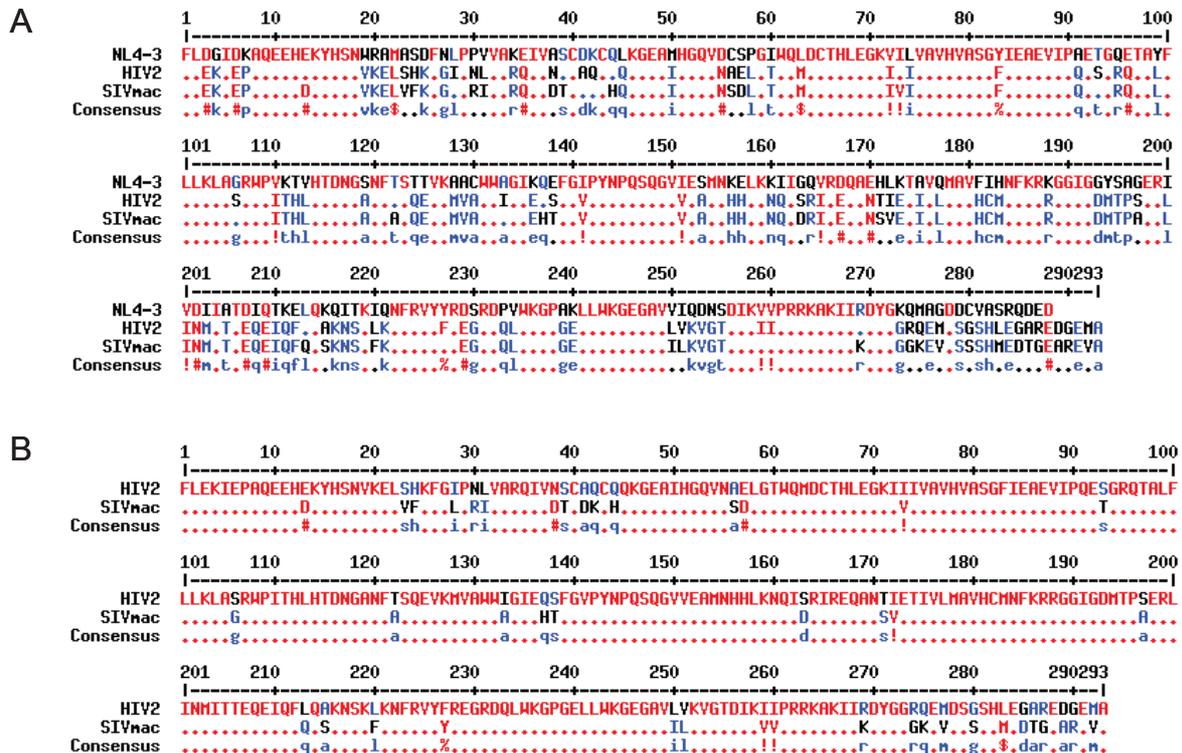


Figure 27 : Alignement de séquences de l'IN VIH-1, VIH-2 et SIV.

(A) Alignement multiple des séquences entre l'IN du VIH-1 NL4-3, du VIH-2 rod et du SIVmac 239. (B) Comparaison de la composition en acides aminés des IN VIH-2 rod et SIVmac 239. Les acides aminés communs à toutes les IN sont indiqués en rouge. Lorsqu'il y a des variabilités, les résidus identiques à la séquence consensus sont indiqués en bleu, ceux qui diffèrent en noir.

Actuellement, seule une partie de la protéine IN SIV a été cristallisée. Il s'agit des domaines CCD et CTD constitués des résidus 50 à 293 [402]. La structure partielle contenant quatre domaines CCD et un domaine CTD IN forme une unité asymétrique. Les domaines CCD peuvent être regroupés en dimères de dimère et chaque paire de dimère présente une interface similaire à ce qui est observé pour IN VIH-1. L'unique interaction entre les monomères internes d'IN se fait par liaison van der Waals au niveau de la boucle 190. Le segment composé des résidus 114-121 est à la même position que ce qui est observé pour la structure IN VIH-1. La boucle flexible composée des résidus 141-151 située à proximité du

site actif n'est pas entièrement défini néanmoins l'emplacement de l'acide aminé E₁₅₂ de la triade catalytique n'est pas ambiguë. Les résidus 210-218 faisant le lien avec le domaine CTD ont pu être tracés par l'extension du CCD et l'architecture en trois dimensions du CTD est similaire au CTD VIH-1. La structure trois dimensions partielle de l'IN SIV est présentée dans la figure 28.

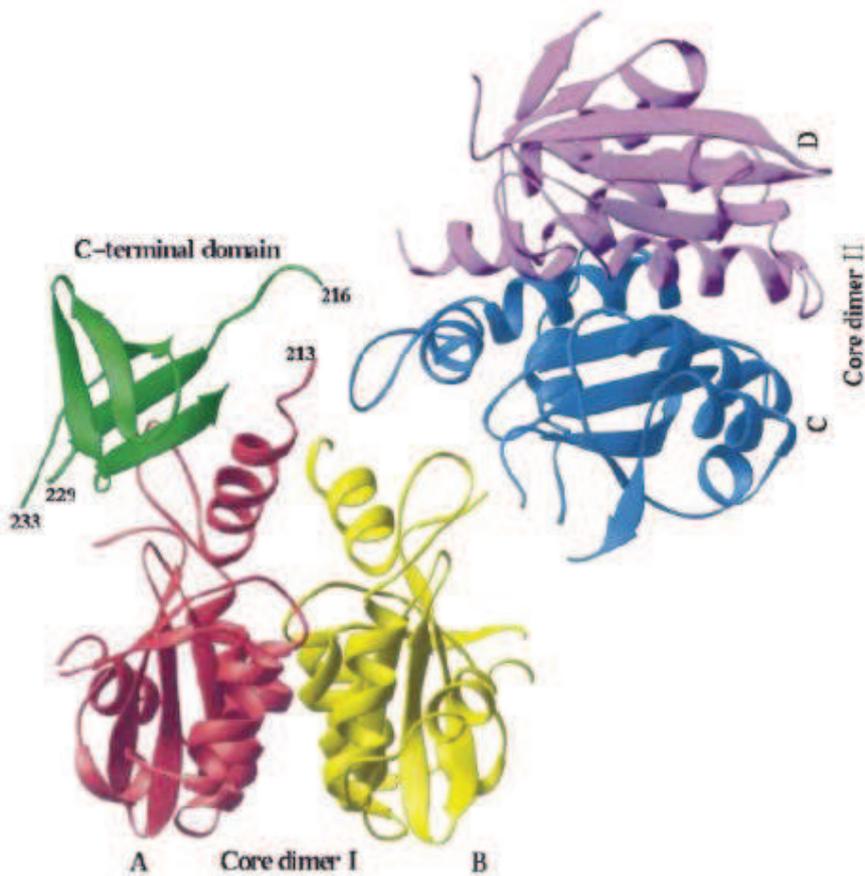


Figure 28 : Structure partielle de l'IN SIV.

La structure cristallisée contient quatre domaines CCD IN SIV regroupés sous forme de dimère de dimères. Les quatre sous unités sont représentées en rose et jaune pour le premier dimère (A-B) et bleu et violet pour le second (C-D). Seul un domaine CTD a pu être étendu à partir de la structure du monomère A, représenté en vert [402].

Les résidus de ces deux domaines prétendent être impliqués dans la liaison de l'ADN sur IN VIH-1 sont localisés sur la même face de la molécule SIV. Ils comprennent Asp64, Asp116, Glu152 et Lys159 du domaine CCD et Arg231, Leu234, Arg262, Arg263 et Lys264 du domaine CTD. Un modèle de liaison à l'ADN est suggéré via l'interaction de la boucle composée des résidus 228-236 du domaine CTD et la boucle flexible 141-151 du domaine CCD.

3. Etude de l'effet des inhibiteurs d'IN sur l'infection SIV

Une étude réalisée par Hassounah et al a utilisé le modèle SIVmac 239 afin d'étudier l'effet des mutations de résistance aux INSTIs [403]. En comparant les séquences des IN VIH-1 et SIV ils ont pu mettre en évidence que les résidus dont la mutation entraîne une résistance aux INSTIs RAL et EVG sont conservés dans le CCD IN SIV. Ils ont alors introduit différentes mutations connues pour induire une résistance aux INSTIs (G118R, Y143R, Q148R, N155H et R263K) dans le gène codant pour l'IN SIV. Par le biais d'expérimentations d'infection avec ces différents virus mutants SIV en présence d'INSTIs, ils ont pu mettre en évidence que les mutations de résistance aux INSTIs lorsqu'elles sont introduites dans le SIV résultent en un phénotype similaire. Ainsi ces résultats suggèrent que le VIH et le SIV utilisent des profils similaires de voie de résistance et que le SIVmac 239 pourrait être un bon modèle de primate non humain pour l'étude des résistances aux INSTIs. Le même laboratoire a confirmé ces résultats dans des cellules primaires PBMCs de macaques rhésus avec un panel plus important de mutations de résistance aux INSTIs [404]. L'ensemble de ces observations confirme que les mutations associées à la résistance aux INSTIs pour le VIH-1 montrent des profils similaires d'infection pour le SIV.

L'efficacité des INSTIs sur l'IN VIH-1 et SIV a également été démontré dans des expérimentations d'infection de macaques rhésus par un virus chimérique SHIV [405]. Lorsque le traitement basé sur l'utilisation d'INSTI est initié avant la déplétion des cellules CD4+ cela entraîne la diminution de la virémie, le maintien du pool de CD4+ et l'apparition d'une réponse immunitaire spécifique. Ces résultats basés sur un modèle simien ont permis de mettre en évidence l'activité antirétrovirale des INSTIs *in vivo*.

La protéine cellulaire LEDGF étant très conservée chez les primates, seule une substitution diffère entre la séquence de LEDGF humaine et simienne, et l'interaction entre IN SIV et LEDGF ayant déjà été démontrée [280], l'utilisation d'un modèle SIVmac pour l'étude du spectre d'activité des INLAI peut être envisagé. Cependant il faut prendre en compte que même si le domaine CCD est le plus conservé entre IN VIH-1 et le SIV, il subsiste des différences, y compris dans le site de fixation à LEDGF, comme les résidus A128M, A129V, E170N et H171S. La mutation A128T sur l'IN du VIH-1 confère une résistance à la majorité des INLAI répertoriés à ce jour et certaines études préliminaires ont déjà montré que la différence de séquence sur ce résidu clé, notamment M128 sur IN SIV, semble également induire ce phénomène de résistance pour d'autres lentivirus [340,345,352]. D'autres modifications d'acides aminés impliqués indirectement dans la poche hydrophobe pourraient également modifier l'environnement de l'interface d'interaction IN-LEDGF.

V - Système immunitaire et VIH-1

A - Le tropisme du VIH-1

1. Les modes de transmission

Le virus VIH-1 possède plusieurs voies d'entrée dans l'organisme de son hôte.

La transmission la plus courante a lieu par voie sexuelle, ainsi le VIH-1 franchit la barrière épithéliale en s'infiltrant dans des brèches ou des sites d'inflammation afin de pénétrer dans les muqueuses génitales et/ou rectales dans lesquelles sont retrouvées certaines des cellules cibles du VIH-1 : les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques permettant une fois infectées la dissémination du virus dans l'organisme à plus large échelle [406].

Le VIH-1 peut également se transmettre par voie sanguine notamment lors d'un contact avec du matériel invasif contaminé comme par exemple chez les toxicomanes ou le personnel hospitalier. Au cours des premières années de l'épidémie des cas de transmission lors de transfusions sanguines ont aussi été référencées cependant la mise en place d'un dépistage pour chaque don de sang a permis d'abolir cette voie d'accès.

La transmission materno-fœtale est la source de plus de 90% des infections identifiées chez les enfants et peut entraîner l'apparition de graves malformations congénitales allant même jusqu'au décès du fœtus. Plusieurs facteurs de risque semblent influencer ce type de transmission comme la quantité de charge virale, le type d'infection ou l'infection concomitante avec d'autres pathogènes. La transmission de la mère à l'enfant peut se dérouler in utero, au cours de la naissance ou post-natale lors de l'allaitement. Au cours de la grossesse l'amincissement et l'apparition de lésions dans la barrière placentaire facilite les échanges cellulaires dans la circulation sanguine du fœtus. Les virions VIH-1 pourraient être capables d'infecter les cellules trophoblastiques formant la barrière placentaire ou la traverser directement par transcytose [407]. Lors de l'accouchement la pratique de césariennes diminue considérablement le risque de contact avec les sécrétions vaginales et le sang contaminé de la mère. Enfin l'allaitement peut induire la transmission de cellules infectées dans les voies intestinales ou les amygdales du nourrisson.

2. Les cellules du système immunitaire

Une fois dans l'organisme, le virus franchit la barrière épithéliale et peut entrer en contact avec les lymphocytes CD4⁺ et les cellules de Langerhans. Des abrasions à la surface mucosale permettent la rencontre directe au niveau de l'épithélium basal et du stroma du VIH-1 avec ses cellules cibles : les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les macrophages [408] (figure 29).

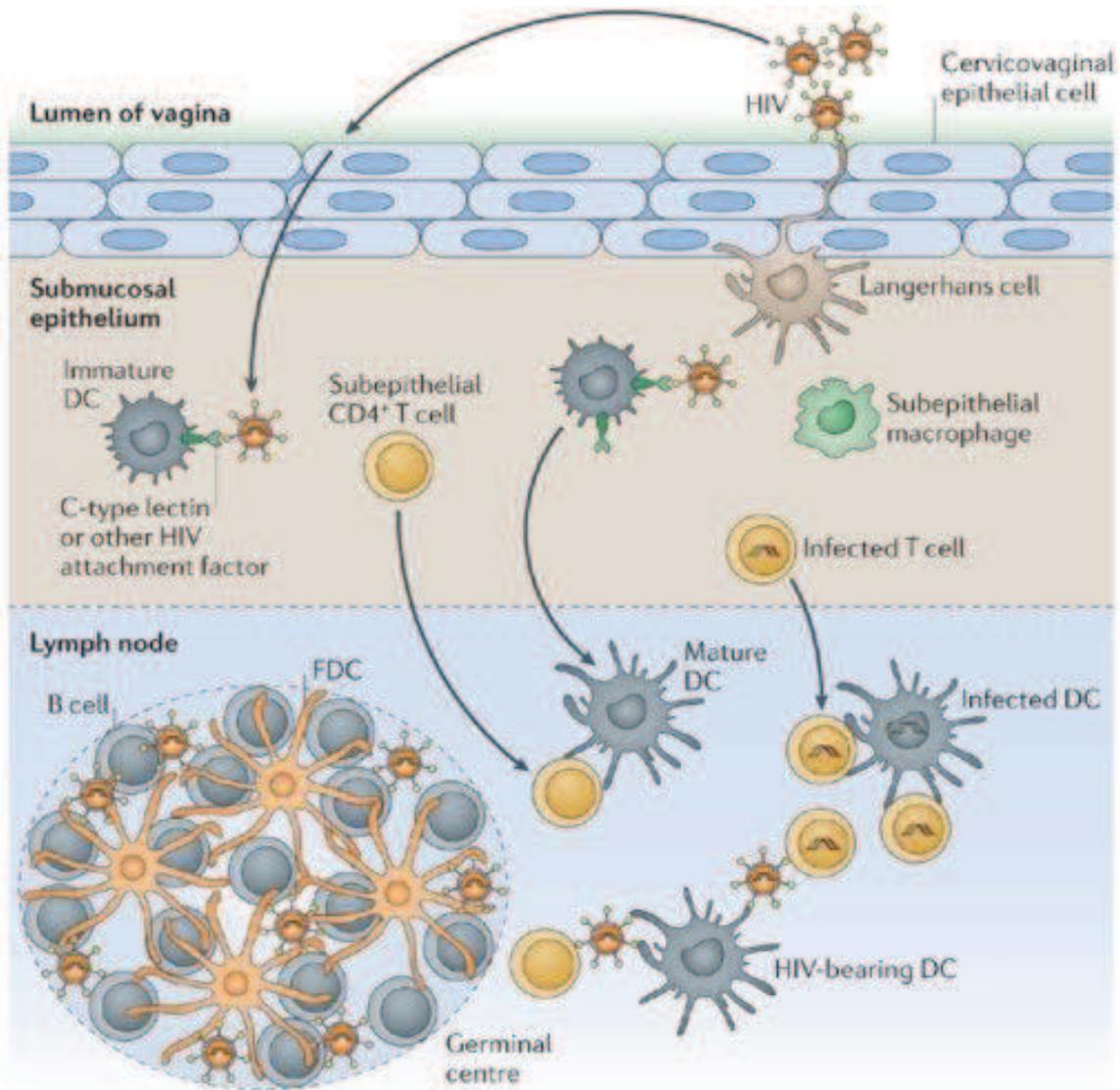


Figure 29 : Dissémination du VIH-1 et infection des cellules du système immunitaire.

Lors de la transmission sexuelle le VIH atteint la surface muqueuse où il est capturé par les cellules dendritiques (DC) immatures. Les DC immatures migrent dans les tissus lymphoïdes où elles sont différenciées en DC matures et peuvent présenter les antigènes viraux aux lymphocytes T permettant ainsi la dissémination du virus. Le VIH-1 peut également infecter de manière directe des lymphocytes T CD4⁺ et des macrophages [409].

a) Les cellules dendritiques

Lors d'une infection, les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle essentiel dans la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative. Dans les muqueuses les DC immatures circulent en continu afin de reconnaître et d'internaliser les pathogènes traversant la barrière épithéliale. L'internalisation du pathogène initie la maturation des DC qui migrent alors vers les tissus lymphoïdes tels que les ganglions lymphatiques. Ces tissus étant fortement enrichis en lymphocytes T CD4+ (LT4), les DC matures peuvent alors induire l'activation des LT4 via la présentation d'antigènes viraux préalablement digérés.

Étant donné leur localisation dans les muqueuses orales et vaginales ainsi que dans les tissus lymphoïdes, il a été proposé que les DC soient parmi les premières à entrer en contact avec le VIH-1 lors de transmission sexuelle. Il a également été suggéré que les DC jouent un rôle important au niveau des tissus lymphoïdes dans la propagation du VIH-1 aux LT4 qui sont la principale source de réplication et de dissémination du VIH-1 [409].

En ce qui concerne l'infection par le VIH-1, deux voies d'entrée des virions dans les DC ont été décrites. Les DC présentent dans le stroma expriment à leur surface la molécule DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM3)-grabbing non-integrin). La molécule DC-SIGN interagit avec la protéine d'enveloppe gp120 permettant l'internalisation de plusieurs virions VIH-1 au sein de vésicules d'endocytose qui seront ensuite phagocytés [410,411]. Les DC sont également sensibles à l'infection « naturelle » car elles expriment à leur surface le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 du VIH-1 [412,413].

Il est important de noter qu'un sous-type particulier de DC nommé cellules de Langerhans, semblent également sensibles à l'infection par le VIH-1. Ces cellules présentent dans les muqueuses possèdent à leur surface le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 et CXCR4 du VIH-1 [414] ainsi que la protéine cellulaire langerine qui semble impliquée dans la capture de virions afin de protéger les cellules de Langerhans de l'infection [415]. Cependant ces observations sont encore controversées.

L'infection par le VIH-1 des DC interfère avec leur capacité de présentation d'antigènes ce qui contribue à l'évasion virale face au système immunitaire de l'hôte. En effet les DC provenant d'individus porteurs du VIH-1 sont nettement moins efficaces pour stimuler l'activation des lymphocytes T en comparaison avec des DC de donneurs sains [416]. Cependant l'impact de l'infection par le VIH-1 des DC sur leur capacité d'activation de réponses T spécifiques n'est pas encore clairement défini. Il a notamment été montré que les DC matures de patients infectés ne permettent pas la stimulation de réponse cellulaire de

type T induisant la synthèse de la cytokine IL-10 impliquée dans une réponse immunosuppressive [417]. Au contraire, certaines études ont mis en évidence que les DC de patients infectés peuvent induire efficacement une réponse associée aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques [418]. Ce qui suggère que la modulation induite par le VIH-1 des molécules de présentation des antigènes sur les DC n'empêche pas nécessairement leur capacité d'activation de la réponse cytotoxique.

La transmission du VIH-1 entre les DC infectées et les LT4 passe par différentes voies. Un mécanisme de trans-infection implique les jonctions cellules-cellules formant la synapse dite infectieuse médiée par les molécules DC-SIGN. Une seconde voie de trans-infection est corrélée à la libération d'exosomes associés au VIH-1. La voie de cis-infection est associée à la libération de particules virales fonctionnelles suite à la réplication du virus dans les DC. L'ensemble de ces mécanismes coexistent *in vitro* et semblent impliquer les corécepteurs CCR5 et CXCR4 du VIH-1 [409].

b) Les lymphocytes T

Succinctement, l'infection par un pathogène induit tout d'abord l'activation de la réponse immunitaire dite innée. Il s'agit d'une réponse rapide à l'infection faisant intervenir de nombreux facteurs cellulaires induisant notamment le phénomène d'inflammation. Les DC jouent essentiellement un rôle clé dans l'établissement de la réponse adaptative plus lente mais spécifique. La maturation des DC, stimulée par les cytokines IL-4 et GM-CSF, confère à ces cellules leur capacité de présentation d'antigène. L'activation des LT4 par les DC contribue par la suite à l'élaboration de réponse T de type Th1 ou Th2 via la sécrétion de cytokines IL-12 et IFN- γ ou IL-4 respectivement. Les lymphocytes Th1 sécrètent à leur tour un panel de cytokines et de chimiokines dont IL-2, IL-3, IL-12, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF... permettant entre autre l'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques permettant la lyse des cellules infectées et l'activation des lymphocytes B associés à la mise en place d'une réponse humorale médiée par la production d'anticorps ciblant spécifiquement des épitopes du pathogène. L'activation de la voie Th2 est également impliquée, et de manière plus efficace dans cette réponse humorale.

Les lymphocytes T CD4+ (LT4) représentent la cible majeure du VIH-1. Comme indiqué précédemment la présence à la surface du récepteur CD4 et du corécepteur CCR5 ou CXCR4 est nécessaire à la reconnaissance et l'entrée du virus dans les LT4. Suite à la présentation d'antigènes viraux par les DC, Les LT4 activés prolifèrent permettant ainsi la

réplication rapide et efficace du virus. Dans ces conditions de primo-infection la réplication du virus est associée à un fort effet cytopathique dans ces cellules, diminuant ainsi considérablement le temps de demi-vie des LT4 activés infectés étant normalement de plusieurs jours. Le VIH-1 possède également la capacité d'infecter les LT4 mémoires et ainsi former un réservoir de latence virale.

La mise en place d'une réponse immunitaire adaptative lors de la primo-infection au VIH-1 conduit notamment à la prolifération de lymphocytes T CD8+ (LT8) conduisant à l'augmentation de leur concentration dans le sang de patients infectés qui est corrélée à une diminution de la charge virale. Les cellules LT8 sont dites cytotoxiques car elles peuvent reconnaître des antigènes viraux à la surface de cellules infectées et induire leur lyse via la sécrétion de perforines. Ainsi leur activité cytotoxique spécifique représente une arme majeure mise en place par le système immunitaire pour l'élimination de cellules infectées par le VIH-1, cependant lors de l'établissement du stade SIDA la réplication excessive du virus est corrélée à une forte déplétion des LT8.

c) Les lymphocytes B

Les lymphocytes B interviennent plus tardivement dans l'établissement de la réponse immunitaire adaptative et sont les acteurs de la réponse humorale. Une fois activés par les lymphocytes T, leur maturation permet le déclenchement de la production d'anticorps. Le VIH-1 n'est pas capable d'infecter les lymphocytes B, cependant l'infection induit des effets délétères dans la mise en place d'une réponse humorale stable. Il a notamment été montré que le VIH-1 est capable de se fixer à la surface des lymphocytes B ce qui induit le recrutement des protéines du complément naturellement impliqués dans l'immunité innée et ayant pour rôle d'éliminer les cellules infectées [419]. De plus il a été mis en évidence que l'infection par le VIH-1 est associée à une hyperactivation des lymphocytes B conduisant notamment à la production d'anticorps reconnaissant le soi [420].

d) Les autres cellules immunitaires

Les macrophages et les monocytes présentent également à leur surface les molécules CD4, CCR5 et CXCR4 faisant de ces types cellulaires des cibles supplémentaires de l'infection par le VIH-1 [421]. Les macrophages infectés sont moins sensibles que les LT4 à l'effet

cytopathique induit par l'infection et leur capacité à traverser les barrières hémato-encéphaliques suggère qu'elles pourraient être la source de la dissémination du virus dans le système nerveux centrale [422]. L'infection par le VIH-1 des macrophages semble également participait à l'établissement d'un état d'inflammation chronique en modifiant notamment leur capacité de présentation et de destruction de pathogènes [423].

Les cellules immunitaires NK (natural killer) semblent protéger l'organisme de la progression de la maladie, cependant l'infection par le VIH-1 conduit à un changement de la nature des cellules NK circulantes qui présentent dans ce contexte un défaut dans leur capacité d'induire la lyse cellulaire et de synthétiser diverses cytokines impliqués dans la réponse immunitaire [424].

3. Les stratégies vaccinales

Le développement d'un vaccin anti-VIH spécifique, efficace et globalement abordable offre le meilleur espoir pour le contrôle à long terme de la pandémie de SIDA. Depuis 1987, de nombreux candidats de vaccins VIH-1 ont été développés et montrent des degrés variables d'induction de réponse immunitaire spécifique dans des modèles de primates non humains. Plusieurs types de protections incluant des vaccins ADN, des vaccins sous unitaires basés sur les protéines env et tat, des vaccins recombinants vivants atténués ou inactivés ainsi que des combinaisons variables de « prime-boost » ont été testés afin d'induire une réponse immunitaire de type B, de type T ou la combinaison des deux. L'activité de certains de ces candidats vaccins a également été évaluée sur un panel de volontaires chez l'Homme en vue de thérapies prophylactiques ou curatives. Mais malgré le fait qu'ils puissent retarder la progression de la maladie chez l'Homme, la plupart d'entre eux n'a pour l'instant pas montré d'efficacité suffisante dans la prévention de l'infection ou dans le contrôle de la réplication du VIH-1 [425].

Jusqu'à présent, le seul essai vaccinal prometteur est celui mené en Thaïlande à partir du vaccin RV144. Cette étude est basée sur l'utilisation d'un vecteur exprimant des gènes du VIH-1 comme « prime » suivie de deux « boost » d'injections d'un vaccin recombinant de la glycoprotéine d'enveloppe virale [426]. Cet essai résulte cependant à un faible niveau d'efficacité vaccinale de l'ordre de 30%. De plus cette protection contre l'infection VIH-1 n'induit pas la production d'anticorps neutralisants à large spectre ou la mise en place d'une réponse cytotoxique LT8 spécifique. La diminution de l'infection semble plutôt être associée aux anticorps IgG ciblant la région V1V2 de la protéine d'enveloppe du VIH-1 [427].

Dans le but de développer un vaccin préventif efficace anti-VIH-1, il est donc actuellement admis qu'un élément crucial est la mise en place d'une réponse humorale associée à la production d'anticorps neutralisants. En effet l'association d'une réponse humorale efficace à une réponse T cytotoxique, conduisant à l'élimination de cellules préalablement infectées ou de cellules ayant échappé aux anticorps neutralisant, devrait théoriquement permettre la mise en place d'une réponse immunitaire réelle et efficace contre l'infection VIH-1.

Ainsi les efforts actuels dans le domaine des thérapies vaccinales visent à induire la production d'anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs) afin de neutraliser un large éventail de variants du VIH-1 et augmenter la protection face à la mutation rapide du virus [428]. Les bNAbs sont depuis longtemps considérés comme la protection vaccinale optimale car la prévention des maladies causées par la plupart des virus répertoriés à ce jour est associée à la production de ce type d'anticorps dans les jours suivant l'infection. Si le patient survit à l'infection, les bNAbs permettent généralement l'élimination efficace du virus et induisent une protection à très long terme contre de nouvelles infections associées le même pathogène.

Lors d'une infection naturelle VIH-1, les antigènes viraux présentés au système immunitaire ne permettent pas d'induire une réponse immunitaire suffisante pour éliminer le virus car celui-ci possède la capacité unique d'intégrer son génome dans celui de son hôte. Néanmoins l'infection VIH-1 induit un haut niveau de production de bNAbs dans un petit nombre de patients, habituellement après plusieurs années d'infection [428]. Ces observations sont la preuve qu'un vaccin induisant la production de bNAbs est envisageable pour lutter contre l'infection VIH-1.

Dans ce but, de nombreuses études ont été réalisées notamment afin de déterminer la conformation native des protéines de l'enveloppe du VIH-1 ou d'isoler des cellules B rares, y compris dans la lignée germinale, reconnaissant des épitopes de l'enveloppe. Le meilleur candidat pouvant servir d'immunogène dans le développement de vaccins induisant la production de bNAbs contre le VIH-1 a été défini comme étant la glycoprotéine d'enveloppe sous une forme permettant la présentation d'épitopes de manière native. L'enveloppe du VIH-1 étant intrinsèquement instable, les épitopes présentés préférentiellement au système immunitaire lors de l'infection provoquent la production d'anticorps n'induisant pas de neutralisation à large spectre. Des études ont permis de mettre en évidence que les anticorps non neutralisants se lient à l'enveloppe instable alors que les bNAbs se fixent expérimentalement sur des éléments de structure de l'enveloppe virale, stabilisée sous forme de trimère, correspondant à sa conformation naturelle sur les virions sauvages [429]. Ces résultats suggèrent que le trimère de glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 constitue un

immunogène potentiel majeur pour activer la réponse B et la production de bNAbs. Une structure stable de trimère d'enveloppe contenant divers mutations a pu être mis en évidence [430], l'étape suivante consiste à vérifier si la stimulation de lymphocytes B naïfs permet la production de bNAbs afin d'envisager à plus long terme une thérapie vaccinale incluant ce type d'immunogène.

OBJECTIFS DE MES TRAVAUX DE THESE

Afin de lutter contre la pandémie SIDA causée par l'infection au VIH-1, les trithérapies ont démontré leur efficacité dans le traitement des patients infectés. En effet la forte variabilité du VIH-1 impose l'utilisation de thérapies combinant plusieurs antirétroviraux de classe différente. Aujourd'hui plus d'une trentaine d'antirétroviraux VIH-1 ont été référencés et sont classés en plusieurs catégories en fonction de l'étape du cycle répliatif du VIH-1 qu'ils ciblent [431]. Bien qu'il existe actuellement des traitements considérés comme hautement actifs nommés HAART (Highly active antiretroviral therapy), l'émergence et la transmission de virus multirésistants aux différentes classes d'antirétroviraux sur le marché pharmaceutique apparaît être un problème de santé majeur [142,432]. Dans le but d'élaborer un nouvel arsenal thérapeutique innovant et efficace contre ces virus résistants, il est donc primordial de développer de nouvelles classes d'antirétroviraux possédant un mécanisme d'action entièrement différent.

La majorité des classes d'antirétroviraux actuellement sur le marché ciblent principalement les enzymes virales comme la RT (reverse transcriptase) et la PR (protéase). Depuis ces dernières années, les recherches menées dans ce domaine s'intéressent notamment au développement de composés capables d'inhiber la troisième enzyme virale IN (intégrase). En effet son rôle essentiel dans la réplication virale du VIH-1 et l'absence de fonctions équivalentes dans les cellules humaines fait de l'intégrase une cible de choix pour de nouvelles thérapies antirétrovirales. Dans cette optique, plusieurs molécules d'une nouvelle classe d'antirétroviraux nommées INSTIs (integrase strand transfert inhibitors) ont été développées. Le raltegravir (RAL) est le premier INSTI approuvé dans le traitement du SIDA en 2007 [106]. Depuis, deux INSTIs supplémentaires sont également utilisés dans les thérapies ART : l'elvitegravir (EVG) et le dolutegravir (DTG) [107,302,303]. Ces composés antiviraux ont la particularité de se lier au site actif de l'enzyme et ainsi d'inhiber efficacement la réaction de transfert de brin médiée par l'IN qui est nécessaire à l'étape d'intégration du cycle de réplication du VIH-1 [106]. Les traitements actuels basés sur l'utilisation d'INSTIs, notamment ceux combinant le DTG, montrent une faible toxicité et sont très efficaces pour supprimer la réplication du VIH-1 chez les patients traités [304]. Néanmoins l'apparition de mutations conférant une résistance croisée à l'ensemble de ces molécules a été rapportée, ce qui limite leur utilisation en traitement de seconde intention chez des patients en échec thérapeutique suite à une thérapie basée sur les INSTIs [330,331,332].

Le principal cofacteur de l'IN du VIH-1 est la protéine cellulaire LEDGF/p75 (Lens Epithelium-Derived Growth Factor). Il s'agit d'une protéine nucléaire interagissant avec la

chromatine. Son interaction avec l'IN est cruciale pour la réplication du VIH-1 car elle permet de cibler les régions transcriptionnellement actives du génome de l'hôte où le provirus est préférentiellement intégré [433]. Le rôle clé de l'interaction IN-LEDGF lors de l'étape d'intégration du VIH-1 en fait une cible thérapeutique de premier ordre afin de cibler l'IN par un mécanisme d'action différent de celui des INSTIs. Ainsi suite à l'identification des résidus impliqués dans l'interaction IN-LEDGF sur les deux partenaires [236,292] et l'élucidation par cristallographie de la structure en trois dimensions de l'interface IN-LEDGF, un nouveau pharmacophore différent du site catalytique ciblé par les INSTIs a pu être défini [292]. Plusieurs sociétés pharmaceutiques ont dès lors identifié des inhibiteurs de l'interaction IN-LEDGF. Les premières molécules rapportées ont été les tBPQAs (tert-Butoxy-(4-phenyl-quinolin-3-yl)-acetic acids) et les LEDGINS (2-(tert-butoxy)-2-substituted acetic acid derivatives) respectivement par Boehringer Ingelheim (BI) [339] et le laboratoire de Zeger Debyser [340,341].

Plusieurs caractéristiques des tBPQAs et des LEDGINS ont déjà été rapportées. Ces molécules sont donc capables d'inhiber l'interaction IN-LEDGF mais induisent également une inhibition de l'activité catalytique de l'IN permettant les réactions de 3' processing et de transfert de brin de l'intégration. De plus leur fixation induit un changement conformationnel non fonctionnel de l'IN dû à l'augmentation de sa multimerisation. Au vue de la pluralité de leur activité antivirale sur des domaines différant de leur site de fixation, ces inhibiteurs sont dès lors considérés comme allostériques et nommés ALLINIs (Allosteric IN inhibitors) [279,294,342,434]. Depuis, différents acronymes ont été proposés pour décrire cette classe d'inhibiteurs de l'interaction IN-LEDGF : LEDGINS (LEDGF/p75-IN inhibitors) [340], ALLINs [342] ou encore NCINIs (non-catalytic inhibitor) [339]. Aucun consensus sur leur nom n'ayant encore été défini, et dans un souci de clarté, j'ai choisi de les regrouper sous le nom d'INLAIs (IN-LEDGF allosteric inhibitor) dans la totalité de mon manuscrit.

De manière surprenante, en complément de leur capacité à inhiber l'étape précoce d'intégration, une seconde activité de ces molécules au niveau des étapes tardives de la réplication du VIH-1 a été rapportée. Cette activité post-intégration des inhibiteurs de l'interaction IN-LEDGF est plus efficace et conduit à la production de virions défectueux en infectivité [341,343,344,352,360]. Les virions VIH-1 produits en présence d'INLAIs ont déjà été caractérisés dans la littérature. Il a notamment été montré que ces virions non infectieux présentent une modification structurelle au sein du core de la particule formé des protéines virales de capsid (CA). Sa morphologie est décrite comme aberrante car elle diffère de la structure conique de virions sauvages matures [343,344,352]. Ces inhibiteurs provoquent une accumulation de la protéine de nucléocapsid (NC) liée à l'ARN viral à l'extérieur du

core de la particule, visible en microscopie électronique par la formation d'agrégats excentriques au niveau de la membrane virale [354]. De plus, il a été démontré que ces molécules sont actives sur des virus porteurs de mutations de résistance aux INSTIs [359]. Les INLAIs appartiennent donc à une nouvelle classe d'inhibiteurs de l'IN qui présente un mécanisme d'action inédit induisant une activité antivirale sur plusieurs étapes du cycle de réplication du VIH-1.

La société biopharmaceutique Mutabilis, avec laquelle j'ai réalisé ma thèse en partenariat, est impliquée dans le développement de nouvelles générations de molécules anti-infectieuses dont des inhibiteurs de l'interaction IN-LEDGF. Suite aux expériences de mise au point de tests de criblage d'activité antirétrovirale menées initialement chez Cellvir et les efforts de chimie médicinale engagés chez Mutabilis, ils ont pu synthétiser de nouveaux inhibiteurs candidats de cette interaction hôte-virus. Ces molécules dérivent de plusieurs séries chimiques originales de la famille des aryl ou heteroaryl-tertbutoxy-acetic acid. Dans ce contexte, l'objectif premier de mon projet de thèse a été de prendre part aux expérimentations en cours, menées par l'équipe de virologie chez Mutabilis, dans le but de caractériser ces molécules comme des inhibiteurs de la classe des INLAIs et d'élucider leur mécanisme d'action. Cette étude a fait l'objet d'une publication parue dans *Retrovirology* en 2013 présentée dans la première partie des résultats de mon manuscrit : « Dual inhibition of HIV-1 replication by integrase-LEDGF allosteric inhibitors is predominant at the post-integration stage » par E. Le Rouzic et al.

Par la suite, mon projet de thèse s'est intéressé à la caractérisation de l'activité antirétrovirale des inhibiteurs de la classe des INLAIs synthétisés par Mutabilis selon deux axes: (1) l'approfondissement des mécanismes d'action de ces INLAIs sur les étapes tardives de la réplication du VIH-1 ; (2) l'appréciation de leur spectre d'activité sur la réplication du virus de l'immunodéficience simienne (SIV).

Des modèles animaux sont couramment utilisés afin d'améliorer la compréhension de la pathogénèse induite par divers agents infectieux ainsi que le développement de vaccins et de thérapies antivirales. Le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) cause chez leurs hôtes non naturels, notamment chez les macaques, une infection persistante progressive similaire au SIDA chez l'Homme [391]. Le SIV de macaques (SIVmac) est donc considéré comme un bon modèle de primates non humains afin d'étudier l'infection par le VIH-1. Sachant que l'interaction IN-LEDGF joue un rôle crucial dans l'étape d'intégration de la plupart des lentivirus animaux [280] et qu'une étude réalisée par le laboratoire de Mark A. Wainberg a démontré que le virus SIVmac est un bon outil afin d'étudier l'effet des mutations de résistance aux INSTIs [403]. Une seconde partie de mes travaux de thèse porte sur

l'appréciation du spectre d'activité de ces inhibiteurs sur le virus SIVmac. L'ensemble des expérimentations réalisées en présence de différents inhibiteurs de l'interaction IN-LEDGF, à la fois *in vitro* mais également sur la réplication et la production de particules virales du SIV, est présentée dans la seconde partie de mes résultats.

L'appartenance des molécules synthétisées par Mutabilis à la nouvelle classe d'inhibiteurs allostériques de l'interaction IN-LEDGF, ainsi que leur efficacité à inhiber les étapes tardives de l'infection au VIH-1 en induisant la production de particules virales avec un fort défaut d'infectivité, ayant été décrite [350]. La dernière partie de mon projet a porté sur la caractérisation des virions synthétisés en présence de ces inhibiteurs, au niveau de leur maturation, leur capacité de réplication mais également au niveau de leur immunogénicité. L'ensemble des résultats obtenus à ce sujet fait l'objet d'une publication en révision présentée dans la dernière partie des résultats de mon manuscrit. La caractérisation de l'infectivité et de l'immunogénicité des particules virales produites en présence de ce type d'inhibiteurs se situe dans le cadre d'une étude exploratoire visant à déterminer si les virus inactivés en présence d'INLAIs pouvaient être utilisés comme nouveau type d'immunogène capable de stimuler la production d'anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs).

RESULTATS

RESULTATS

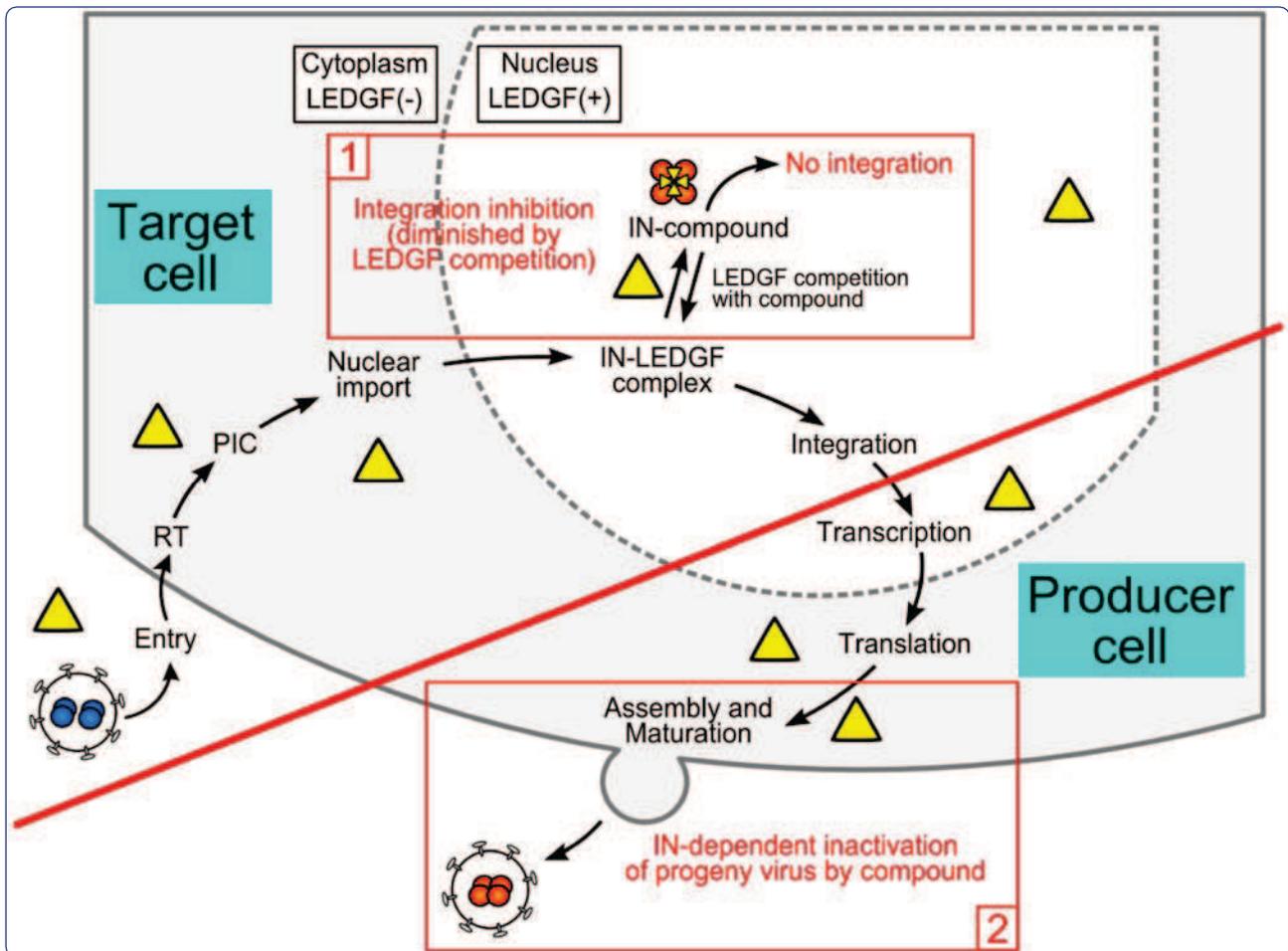
I - Inhibition de deux étapes distinctes du cycle de réplication du VIH-1 par les INLAIs

Le but de cette étude est de caractériser l'activité antirétrovirale des molécules synthétisées par Mutabilis, aussi bien au niveau des étapes précoces que tardives de la réplication du VIH-1. La société Mutabilis a produit des inhibiteurs de l'interaction IN-LEDGF à partir de nouvelles séries chimiques différentes de celles des familles d'INLAIs précédemment décrites. Le composé Mut101 apparaît comme le plus efficace de cette série.

Une étude de la structure en trois dimensions de l'interface d'interaction entre l'IN et LEDGF montre que le composé Mut101 se fixe sur le dimère d'IN au niveau du site de liaison à LEDGF et que cela induit un changement conformationnel sur d'autres résidus de l'IN. Des expérimentations *in vitro* ont permis de montrer que le composé Mut101 inhibe efficacement l'interaction IN-LEDGF et augmente la multimérisation aberrante de l'IN du VIH-1. Mut101 est également capable d'inhiber les réactions d'intégration 3' processing et transfert de brin médiées par l'IN. Le double mode d'action antivirale de Mut101 a été mis en évidence dans des expérimentations en cycle unique ou multiples cycles d'infection. En effet Mut101 inhibe l'intégration du VIH-1 mais son activité la plus efficace est observée sur les étapes tardives de la réplication. L'ensemble de ces résultats confirme que le composé Mut101 fait partie de la classe des INLAIs, inhibiteurs allostériques de l'interaction IN-LEDGF.

Un modèle du mécanisme d'action de ces INLAIs est également proposé. La protéine LEDGF naturellement présente dans le noyau agit comme un compétiteur avec les INLAIs pour la fixation sur l'IN diminuant ainsi leur efficacité sur les étapes précoces. Au contraire lors des étapes tardives, LEDGF est absent dans le cytoplasme et les INLAIs, sans pression de compétition, sont donc plus efficaces pour induire la production de virions défectueux en infectivité.

Ma contribution dans cette publication est la réalisation des PCR quantitatives présentées dans la figure 5.



Dual inhibition of HIV-1 replication by integrase-LEDGF allosteric inhibitors is predominant at the post-integration stage

Le Rouzic *et al.*



RESEARCH

Open Access

Dual inhibition of HIV-1 replication by integrase-LEDGF allosteric inhibitors is predominant at the post-integration stage

Erwann Le Rouzic^{1†}, Damien Bonnard^{1†}, Sophie Chasset¹, Jean-Michel Bruneau¹, Francis Chevreuil¹, Frédéric Le Strat¹, Juliette Nguyen¹, Roxane Beauvoir¹, Céline Amadori¹, Julie Brias¹, Sophie Vomscheid¹, Sylvia Eiler², Nicolas Lévy², Olivier Delelis⁴, Eric Deprez⁴, Ali Saïb⁵, Alessia Zamborlini⁵, Stéphane Emiliani³, Marc Ruff², Benoit Ledoussal¹, François Moreau¹ and Richard Benarous^{1*}

Abstract

Background: LEDGF/p75 (LEDGF) is the main cellular cofactor of HIV-1 integrase (IN). It acts as a tethering factor for IN, and targets the integration of HIV in actively transcribed gene regions of chromatin. A recently developed class of IN allosteric inhibitors can inhibit the LEDGF-IN interaction.

Results: We describe a new series of IN-LEDGF allosteric inhibitors, the most active of which is Mut101. We determined the crystal structure of Mut101 in complex with IN and showed that the compound binds to the LEDGF-binding pocket, promoting conformational changes of IN which explain at the atomic level the allosteric effect of the IN/LEDGF interaction inhibitor on IN functions. *In vitro*, Mut101 inhibited both IN-LEDGF interaction and IN strand transfer activity while enhancing IN-IN interaction. Time of addition experiments indicated that Mut101 behaved as an integration inhibitor. Mut101 was fully active on HIV-1 mutants resistant to INSTIs and other classes of anti-HIV drugs, indicative that this compound has a new mode of action. However, we found that Mut101 also displayed a more potent antiretroviral activity at a post-integration step. Infectivity of viral particles produced in presence of Mut101 was severely decreased. This latter effect also required the binding of the compound to the LEDGF-binding pocket.

Conclusion: Mut101 has dual anti-HIV-1 activity, at integration and post-integration steps of the viral replication cycle, by binding to a unique target on IN (the LEDGF-binding pocket). The post-integration block of HIV-1 replication in virus-producer cells is the mechanism by which Mut101 is most active as an antiretroviral. To explain this difference between Mut101 antiretroviral activity at integration and post-integration stages, we propose the following model: LEDGF is a nuclear, chromatin-bound protein that is absent in the cytoplasm. Therefore, LEDGF can outcompete compound binding to IN in the nucleus of target cells lowering its antiretroviral activity at integration, but not in the cytoplasm where post-integration production of infectious viral particles takes place.

Keywords: HIV, Integrase, LEDGF, Antiretroviral activity, Drug discovery, Allosteric inhibition, Protein-protein interaction inhibitor, Integrase inhibitor, Co-crystallization

* Correspondence: richard.benarous@mutabilis.fr

† Equal contributors

¹Biodim Mutabilis, Romainville 93230, France

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Raltegravir (Merck) and Elvitegravir (Gilead) were introduced in 2007 and 2012 respectively, as the first generation of integrase strand transfer inhibitors (INSTIs) and confirmed integrase (IN) as a clinically validated viral target for antiretroviral (ARV) therapy [1]. The mode of INSTI action was elucidated in complex with a retroviral IN for which the entire 3D structure was defined [2]. However, resistance to INSTIs has emerged in patients [3,4]. A second generation of INSTIs, less sensitive to drug-resistance mutations, has been approved (Dolutegravir (DTG) from GSK-Shionogi-ViiV). DTG belongs to the same class of compounds and remains sensitive to the strongest INSTI resistance mutations [5,6]. This highlights the need for integration inhibitors with completely different mechanism of action.

LEDGF/p75 (LEDGF), the main cellular cofactor of IN [7-9] is of great interest for the development of a novel generation of integration inhibitors. LEDGF interacts with IN through its C-terminal integrase binding domain (IBD). HIV-1 IN catalytic core (IN-CCD) and N-terminal domains are involved in the interaction with LEDGF [7-12]. LEDGF is crucial for integration and replication of HIV [13] although minor residual replication (~10%) was seen in LEDGF-depleted cells [14]. LEDGF functions as a tethering factor for IN, targeting the integration of HIV in actively transcribed gene regions of chromatin [15].

LEDGF binds to the interface of an IN dimer and promotes IN tetramerization which results in the functional form of IN required for concerted integration [16]. The elucidation of the 3D structure of the IN-LEDGF interfaces [11,12], together with the mapping of the critical residues involved [11,17] suggested the "druggability" of this target. The results defined a new IN pharmacophore which is different from the catalytic site targeted by existing INSTIs. A rational screening of the 3D structure by Zeger Debyser and colleagues resulted in the discovery of 2-(quinolin-3-yl) acetic acid derivatives (termed "LEDGINs") as inhibitors of IN-LEDGF interactions [18]. Tert-butoxy-(4-phenyl-quinolin-3-yl)-acetic acids (tBPQAs), analogues with closely related structures, have been identified by screening for inhibition of IN 3' processing activity [19-22]. These tBPQAs are also efficient IN-LEDGF inhibitors. Several analogs to this family of molecules have since had patents submitted and published [23-34].

Several inhibitory activities of LEDGINs and tBPQAs have been reported so far. These include the inhibition of IN-LEDGF interaction, the inhibition of IN strand transfer and 3' processing activities (independent of LEDGF), change in IN oligomerization toward stabilization of IN dimers and inhibition of the formation of the stable IN-viral DNA synaptic complex (SSC) [18,35-38]. These compounds are considered as allosteric

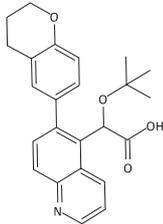
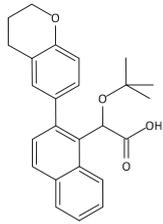
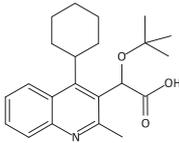
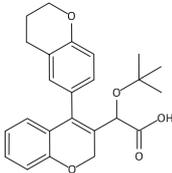
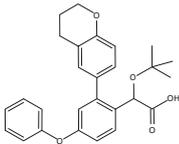
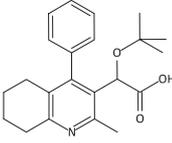
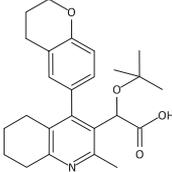
inhibitors of IN that are able to block HIV integration [18,35-40] and are also referred to as ALLINIs [37,40]. These compounds remain fully active on IN mutants that are resistant to INSTIs and are therefore a promising new class of IN inhibitors. An inhibitory effect of LEDGINs on the infectivity of progeny virions has been reported lately [35,41-45]. The multiple activities of these compounds raise questions regarding the unicity or multiplicity of their mechanism of action. Here, we explore what mode of action could explain the multiple activities of these inhibitors. We investigate the respective contribution of these different activities to the overall ARV activity of these compounds using a new series of IN-LEDGF inhibitors from the LEDGIN and tBPQA family of compounds.

Results

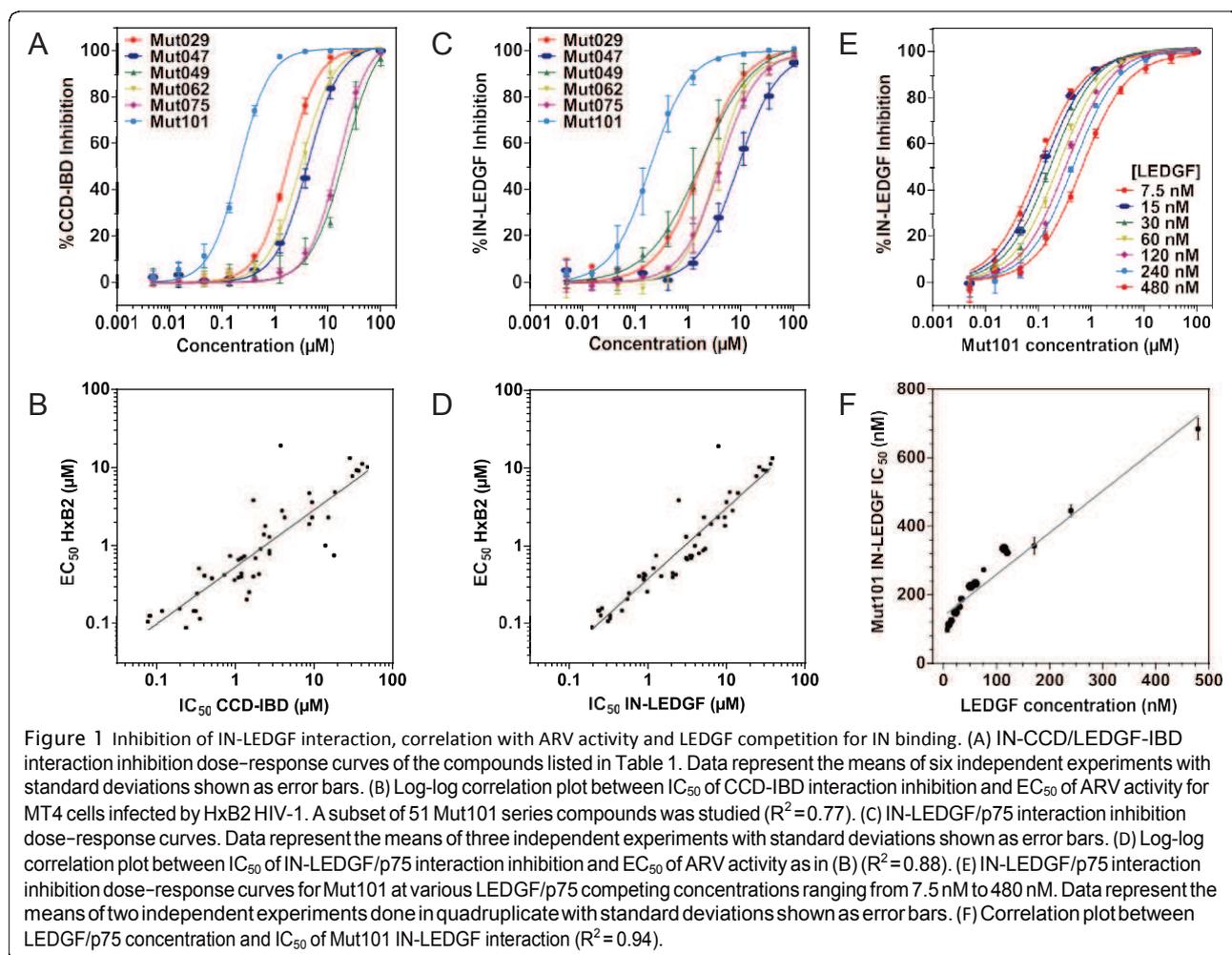
Development of IN-LEDGF allosteric inhibitors

New IN-LEDGF allosteric inhibitors (INLAIs) of the aryl or heteroaryl-tertbutoxy-acetic acid family were designed. The structure and activities of 7 of these compounds are shown on Table 1. These compounds efficiently inhibited IN-CCD/LEDGF-IBD interaction as well as the interaction between IN and full length LEDGF proteins in homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assays (Figure 1A and C). MT4 cells were infected with HxB2 HIV-1 and a subset of 51 compounds showed a good correlation between their ARV activity and their ability to inhibit IN-CCD/LEDGF-IBD or IN-LEDGF interactions (Figures 1B and D). The most active compound for IN-LEDGF inhibition, Mut101, also had the highest ARV activity (an EC₅₀ value of 92 nM against HxB2 infection, CC₅₀ for cytotoxicity was undetectable at over 50 μM (Table 1)). LEDGF was able to compete with these inhibitors, increasing the IC₅₀ of Mut101 on IN-LEDGF interaction inhibition from 0.097 to 0.68 μM (Figure 1E-F). Mut101 and several of these inhibitors were co-crystallized with the IN-CCD dimer, showing that their binding pocket on IN corresponds to the LEDGF-binding site (Figure 2A). Data collection and refinement statistics are given on Additional file 1: Table S1. Two Mut101 molecules bound to the IN-CCD dimer (Additional file 1: Figure S1A). The ligand was found to be in a pocket surrounded by hydrophobic residues on one side, an acidic region on the other side and basic residues at the bottom of the pocket (Additional file 1: Figure S1B). Three hydrogen bonds link the carboxylic acid group of Mut101 and the protein (Figure 2A), one with the hydroxyl group of the side chain of Thr 174, and two with the amino group of the main chain of His 171 and Glu 170. In addition Mut101 was found to interact with two water molecules (Additional file 1: Figure S1C). The IN-CCD structures with and without Mut101 were superimposed. We found

Table 1 Structure and activity of IN-LEDGF inhibitors designed in this study

Compound	Structure	MW (g/mol)	Biochemical assays			MT4 assays		
			CCD-IBD IC ₅₀ (μM)	IN-LEDGF IC ₅₀ (μM)	IN ST IC ₅₀ (μM) plateau (%)	NL4-3 EC ₅₀ (μM)	HxB2 EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
Mut029*		391	1.7	2.5	NT	3.8	3.8	>50
Mut047*		390	3.8	7.9	0.88 70%	16	19	>50
Mut049		355	18	3.5	0.18 56%	2.0	0.75	>50
Mut062*		394	2.7	3.1	0.54 73%	3.3	1.3	>50
Mut063		433	>100	>100	>100 ND	>50	NT	>50
Mut075		353	14	4.0	NT	3.4	1.0	>50
Mut101*		410	0.23	0.20	0.17 66%	0.54	0.092	>50

Structure, molecular weight, and activities of compounds. NT = not tested. *compounds that have been co-crystallized with IN-CCD; IC₅₀ = concentration required to inhibit CCD-IBD interaction, IN-LEDGF interaction or IN strand transfer activity by 50%; EC₅₀ = concentration required to inhibit HIV-1 infection of MT4 cells by 50%; CC₅₀ = concentration required to inhibit MT4 cell viability by 50%.

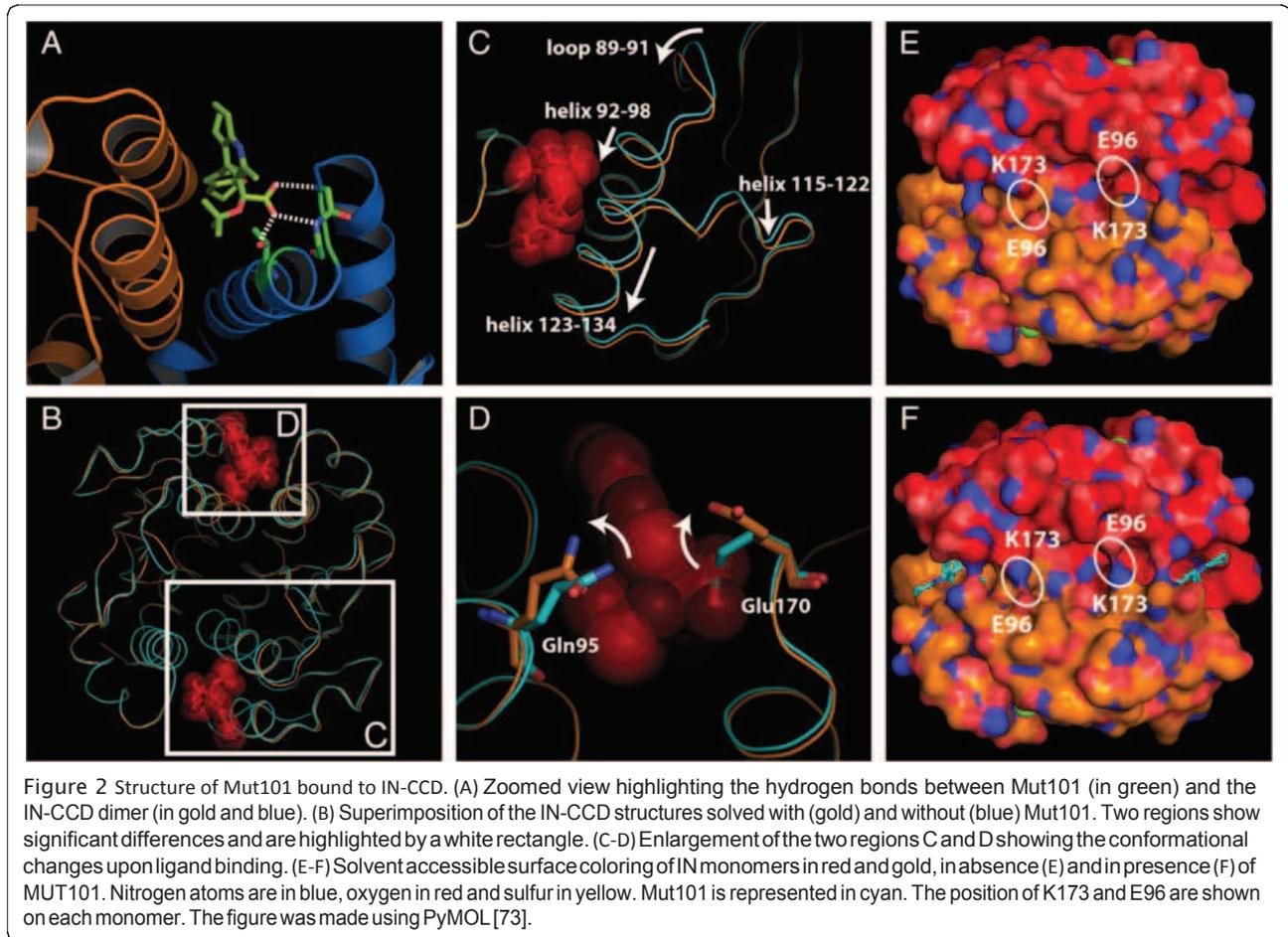


structural differences that appear in two regions (Figure 2B), which contrasts with previously reported IN-CCD/LEDGIN or tBPQA co-structures where no differences were found [18,36,37]. The first region of structure difference encompasses alpha helices 115–122 and 123–134 as well as the alpha helix 92–98. Surprisingly, a strong displacement of the loop encompassing residues Ile 89, Pro 90 and Ala 91 was found to affect the two monomers (Figures 2C). The same differences have been observed with the IN-CCD/LEDGF-IBD structure [11]. The second region of difference is in the Mut101 binding pocket where the side chains of Gln 95 and Glu 170 are displaced (Figure 2D). These long range structural changes are affecting the IN catalytic site, see movie in supplementary (Additional file 2, the catalytic site is at the position of the magnesium ion shown as a green sphere), which explains the decrease in the 3' processing activity in the Mut101 bound form of IN. Upon ligand binding, conformational changes in the dimerization interface lead to stronger interactions, stabilizing the IN dimer. For example, the side chains of Gln 96 and Lys 173 are interacting in the

presence of Mut101 as shown in Figure 2E-F and in the supplementary movie (Additional file 2). These interactions strongly stabilize the IN dimeric form and explain the multimerization effect with the binding of Mut101. Moreover, the structural changes at the IN surface upon Mut101 binding most probably affect IN interaction with protein cofactors and DNA. Altogether these results confirm and explain at the atomic level the allosteric effect of the IN/LEDGF interaction inhibitor.

Effect of IN-LEDGF inhibitors on IN strand transfer and 3' processing activities is independent of LEDGF

We found that these compounds inhibited the IN strand transfer activity as quantitated by ELISA assay (Figure 3A), in agreement with previously reported data, with IC_{50} values in a similar range to those found for inhibition of the IN-LEDGF interaction (Table 1). Activity in the concentration range studied (up to 100 μ M) was always partial (reaching a plateau at 56-73% inhibition), which contrasts the full inhibition obtained using Raltegravir. In contrast with data reported by Christ *et al.* [35],

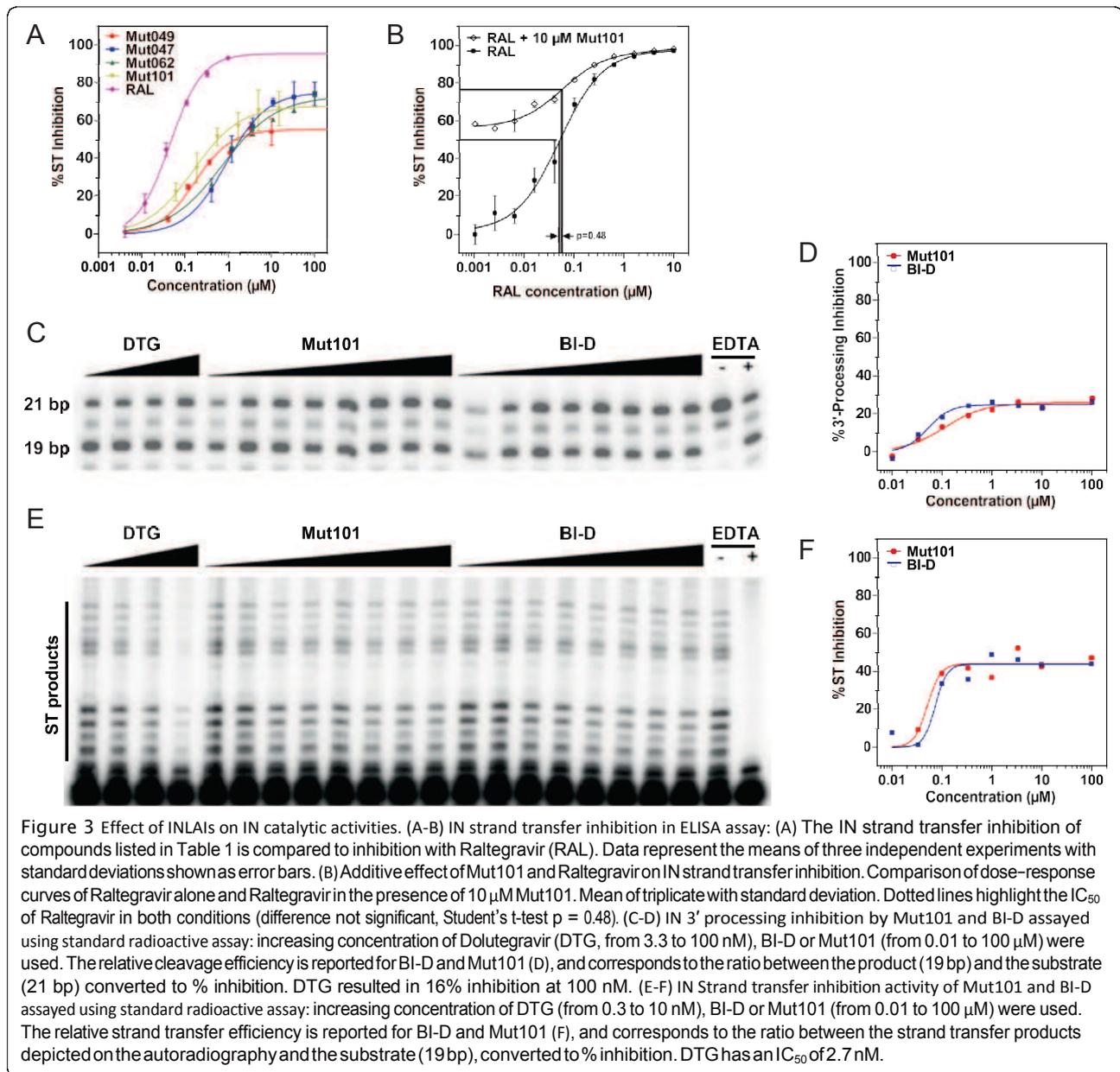


modification of the order of addition of compounds, before or after DNA in this strand transfer assay, did not result in full inhibition (data not shown). This partial and weaker inhibition than that of INSTIs, was confirmed using a typical assay with radioactive oligonucleotide and gel analysis of the strand transfer products (Figure 3E-F). Mut101 and Raltegravir had an additive inhibitory effect on IN strand transfer activity: there was no significant change in the IC₅₀ value of Raltegravir in the presence of a saturating concentration of Mut101 (52 nM vs. 58 nM when both present; Student's t-test: $p = 0.48$; Figure 3B). This IN strand transfer inhibition was found regardless of whether or not the donor DNA was preprocessed [36]. Inhibition of IN 3' processing activity was reported for some INLAIs [37]. We found that increasing concentrations of Mut101 or BI-D lead to a slight decrease in the 3' processing efficiency (with a maximum of 25-30% inhibition, Figure 3C-D), but their inhibition of the IN strand transfer reaction was more important. (Figure 3E-F).

IN-LEDGF inhibitors enhance the IN-IN interaction

We evaluated the ability of IN-LEDGF inhibitors to promote modifications in the interaction between IN

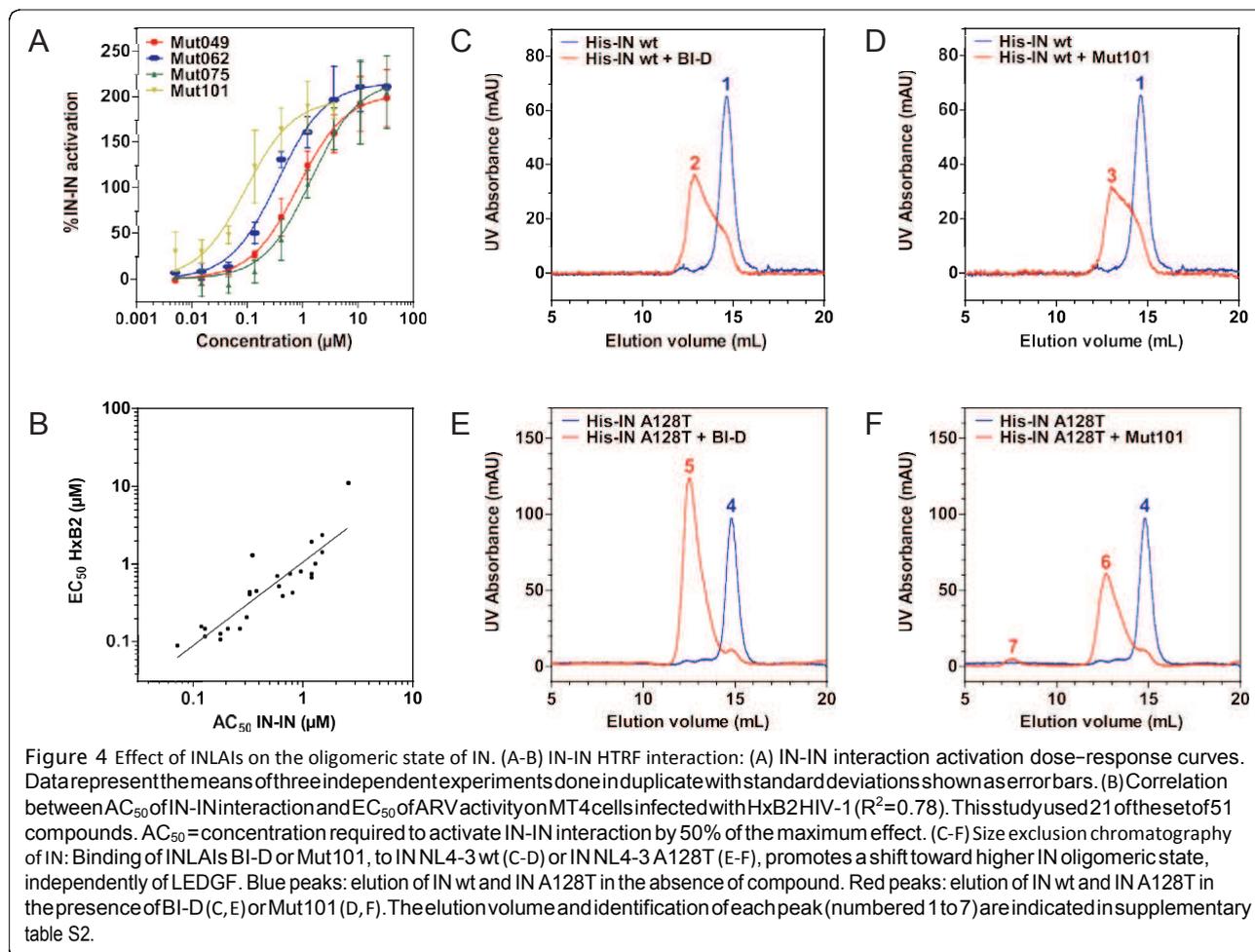
subunits as these inhibitors act at the IN dimer interface. We designed an HTRF-based assay to monitor the interaction between His₆-IN/Flag-IN subunits. In the presence of compound concentrations the HTRF signal corresponding to the His₆-IN/Flag-IN interaction was more than twice as strong as the signal obtained in the absence of compound (Figure 4A). The concentration required to activate the IN-IN interaction by 50% (AC₅₀) closely correlated with the inhibition of the IN-LEDGF interaction and the antiretroviral activity EC₅₀ (Figure 4B). Raltegravir had no effect on either the IN-LEDGF interaction or IN-IN interaction (data not shown). These results are in agreement with previously reported observations on the effect of some LEDGINS and tBPQAs on IN-IN interactions [35-37]. In order to determine if this enhancement of IN-IN interaction corresponds to a change toward higher IN oligomerization state, we performed size exclusion chromatography of IN that has been or not preincubated with Mut101 or with the related compound BI-D. As shown in Figure 4C-D and on Additional file 1: Table S2 for the elution volumes of the different peaks, while IN wt in the absence of INLAIs behaves as an IN dimer (blue peaks), pre-



incubation with Mut101 or BI-D results in higher IN oligomerization state (red peaks), that likely corresponds to a partial formation of IN tetramer. Raltegravir had no effect (data not shown). In contrast with some LEDGINS previously described [18], Mut101 and BI-D conserved full ARV activity on the HIV-1 mutant IN A128T and full in vitro activity on the IN NL4-3 A128T protein mutant. So, we performed similar experiments with this IN A128T protein. As shown in Figure 4E-F and on Additional file 1: Table S2, the higher IN oligomerization state promoted by binding of Mut101 or BI-D to the LEDGF binding pocket, corresponds clearly to a shift from IN dimer (blue peaks) toward IN tetramer (red peaks). This slight difference between the results obtained with IN wt and the IN

A128T mutant is likely due to a more soluble behavior of the IN A128T mutant protein compared to IN wt. In both experiments we did not observe the formation of IN aggregates of very high molecular weight, except for a very minor peak (peak 7) after incubation of IN A128T with Mut101, which elution volume (see Additional file 1: Table S2) could correspond to the formation of such aggregates. However, we cannot exclude that insoluble aggregates are formed but do not enter the gel filtration matrix.

Altogether, we confirmed that, in addition to their ability to inhibit IN-LEDGF, IN-LEDGF inhibitors are allosteric inhibitors of IN and promote IN conformational change by binding to the LEDGF-binding



pocket and mimicking the effect of LEDGF binding to IN [16,46].

Mut101 behaves as an inhibitor of integration in time-of-addition experiments

We performed a time-of-addition experiment (TOA) to identify the HIV-1 replication cycle step that is blocked by Mut101. We used Mut101 at a saturating concentration (25 μ M) and single-cycle infection kinetics with VSV-G-pseudotyped Δ env HIV-1 NL4-3 expressing luciferase as a measure of infection. The kinetics of decreased activity after Mut101 addition were very similar to that observed with Raltegravir, but different to those of Nevirapine, suggesting that Mut101 at saturating concentration behaved as an inhibitor of integration (Figure 5A). This is in full agreement with data reported previously on LEDGINS and tBPQAs [18,36]. The replication cycle analysis by quantitative PCR confirmed that Mut101 inhibited the integration of the proviral DNA (Figure 5C) but not the production of proviral DNA at reverse transcription (Figure 5B).

Mut101 remains fully active against HIV-1 mutants that are resistant to INSTIs and other anti-HIV drugs. Mut101 was tested against a panel of virus mutants harboring, in an NL4-3 background, some of the strongest resistant mutations to INSTIs and other classes of ARV drugs used in clinics [47]. These mutants are listed on Table 2. The activity of Mut101 and reference compounds was quantified by the fold change (FC) ratio between EC_{50} on resistant virus and EC_{50} with the wild type (wt) – a measure of compound efficacy on resistant mutant virus. Mut101 had an FC ratio of 1 or lower against all resistant viruses contrasting the results with reference compounds (Table 3). This demonstrates that Mut101, as IN-LEDGF inhibitor, is a candidate for a novel class of drugs that can act on viruses resistant to those currently used in clinics, including INSTIs.

Unlike INSTIs, the Mut101 series of compounds are more potent when assayed with replicative HIV-1 than with non-replicative pseudotyped virus. The ARV activity of a drug can be assessed using different assays. Multiple round infection using a replication-

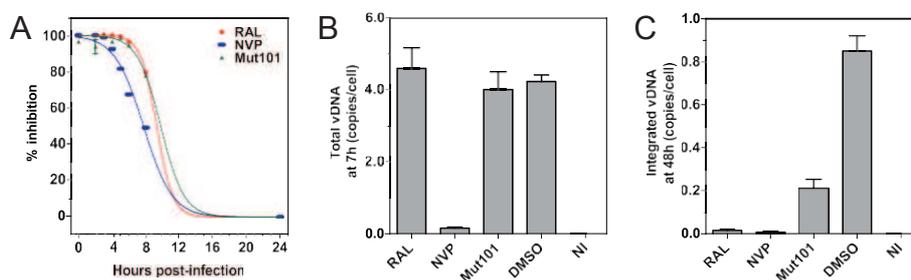


Figure 5 Time of addition experiment and qPCR analysis. (A) Time-of-addition (TOA) experiment in single-round infection assay of MT4 cells infected with VSV-G-pseudotyped HIV-1 Δ env-Luc NL4-3. Each compound (Mut101, Nevirapine (NVP) or Raltegravir (RAL)) was added at the indicated times post-infection. Infection was measured by luciferase assays. Relative inhibition (%) was determined by comparison with the control. qPCR analysis of (B) the formation of proviral DNA at reverse transcription, and (C) the integration of the proviral DNA in the host cell genome after compound treatment as indicated. NI: not infected. Data represent the means of quadruplicates with standard deviations shown as error bars.

competent virus reveals the global ARV activity of a drug, but cannot give an indication as to which step of the viral replication cycle is blocked. All classes of drugs are found fully active in multiple round infection assays. In contrast, in single-round infection, replication-defective Δ env viruses pseudotyped with an exogenous envelope (VSV-G) can complete viral replication only up to integration. This enables drugs like RT or IN inhibitors (fully active because they act early during the replication cycle, before or at integration) to be distinguished from drugs such as protease inhibitors that act late after integration (inactive in the single cycle assay) (see Table 4).

Drugs that act early during reverse transcription (such as AZT and Nevirapine), or at integration (such as Raltegravir) showed ARV activity that is similar or slightly better in single-round (SR) infection assays than in multiple round (MR) infection assays (an EC_{50} SR/ EC_{50} MR ratio of 1 or lower; Table 4). IN-LEDGF inhibitors, as allosteric inhibitors of HIV-1 integrase, were expected to behave similarly to Raltegravir with a SR/MR ratio close to 1. Intriguingly this was not the case. In contrast, Mut101 and the other compounds of this study were much more potent in MR than in SR infection assay with EC_{50} SR/ EC_{50} MR ratios always much higher than 1 and up to 18 for Mut101 (Table 4). Mut101 and the other IN-LEDGF inhibitors also differ from protease inhibitors (PIs) since PIs are active only in MR and completely inactive in SR assays. The Mut101 series of IN-LEDGF inhibitors have an unprecedented mixed

profile with moderate ARV activity in SR and more potent activity in MR infection assays. The two dose-response curves of Mut101 ARV showed that there was no or minimal activity detectable in the SR assay at the concentration resulting in maximum MR activity (Figure 6A). This suggests that the contribution of integration inhibition (estimated by SR assay) to Mut101 overall ARV activity is minimal at this concentration. This contribution becomes significant only at much higher concentrations, such as those used for TOA experiments. Previous infection experiments studying LEDGIs and tBPQAs ARV activity were performed mostly in MR assay. We analyzed the behavior of a tBPQA, racemic BI-D [48] (structure shown in Additional file 1: Figure S2), to determine if the behavior of the Mut101 compound series is shared by other LEDGIs and tBPQAs. We found a similar discrepancy between high EC_{50} in SR (2.4 μ M) and much lower EC_{50} (0.17 μ M) in MR assay.

Mut101 also promotes a post-integration block producing defective HIV-1 progeny virions

The discrepancy between potent ARV activity in MR assays and moderate activity in SR assays, distinguishes Mut101 from INSTIs that specifically block HIV integration. One explanation could be that Mut101 treatment results in a second ARV activity at a late stage of the replication cycle, post-integration. We used the HeLa-LAV system in which the HeLa cell line has been transduced by

Table 2 Resistant viruses used in this study

Resistance mutations to	Gene	Mutations
Protease inhibitor (PI)	Protease	L10R, M46I, L63P, V82T, I84V
Nucleoside RT inhibitor (NRTI)	RT	M41L, D67N, T69N, K70R, T215F, K219E
Non-nucleoside RT inhibitor (NNRTI)	RT	K103N, Y181C
Nucleoside and non-nucleoside RT inhibitor (Multi-drug)	RT	M41L, D67N, K103N, M184V, L210W, T215Y
Integrase strand transfer inhibitor (INSTI)	Integrase	G140S, Q148H

Mutant viruses used in this study that are resistant to PIs, NRTIs, Multi-drugs (NRTI + NNRTI), NNRTIs or INSTIs.

Table 3 EC50 fold-changes on resistant viruses

Compound	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ fold change				
		NL4-3 WT	PI	NRTIs	Multi-drug*	NNRTIs
RAL	0.007	1	1	0.5	1	374
EVG	0.003	1	0.3	0.3	1	2036
AZT	0.14	1	88	10	0.1	0.4
NVP	0.16	1	3	14	287	1
IDV	0.032	9	1	1	1	1
<i>Mut101</i>	0.47	1	1	1	1	1

EC₅₀ fold change (FC) of Mut101, Raltegravir (RAL), Elvitegravir (EVG), Nevirapine (NVP), Zidovudine (AZT) and Indinavir (IDV) (ratio of the EC₅₀ on resistant viruses to the EC₅₀ on the wt virus). Data represent the mean of two independent experiments. * contains resistance mutations against NRTIs and NNRTIs.

HIV-1 LAV virus [49] to test this hypothesis. HIV-1 LAV is constitutively integrated in this cell line and HeLa-LAV cells produce HIV-1 LAV virions that cannot reinfect the cells as they do not express CD4 on their surface. Only drugs that could block virus production at the post-integration step of the HIV-1 replication cycle are expected to be active in this cell line. We treated HeLa-LAV cells with Mut101, Raltegravir, Saquinavir (SQV) or DMSO (as a negative control). The infectivity of viruses produced in the presence of these compounds was tested in TZM indicator cells expressing luciferase and by infection of MT4 cells. The design of this experiment is schematized in Figure 6B. The amount of p24 produced with virus treated by Mut101 was comparable to viruses treated with Raltegravir, DMSO or Mut063 an inactive analogue of Mut101 (Figure 6C). In contrast, luciferase assay in TZM cells showed that Mut101 and SQV

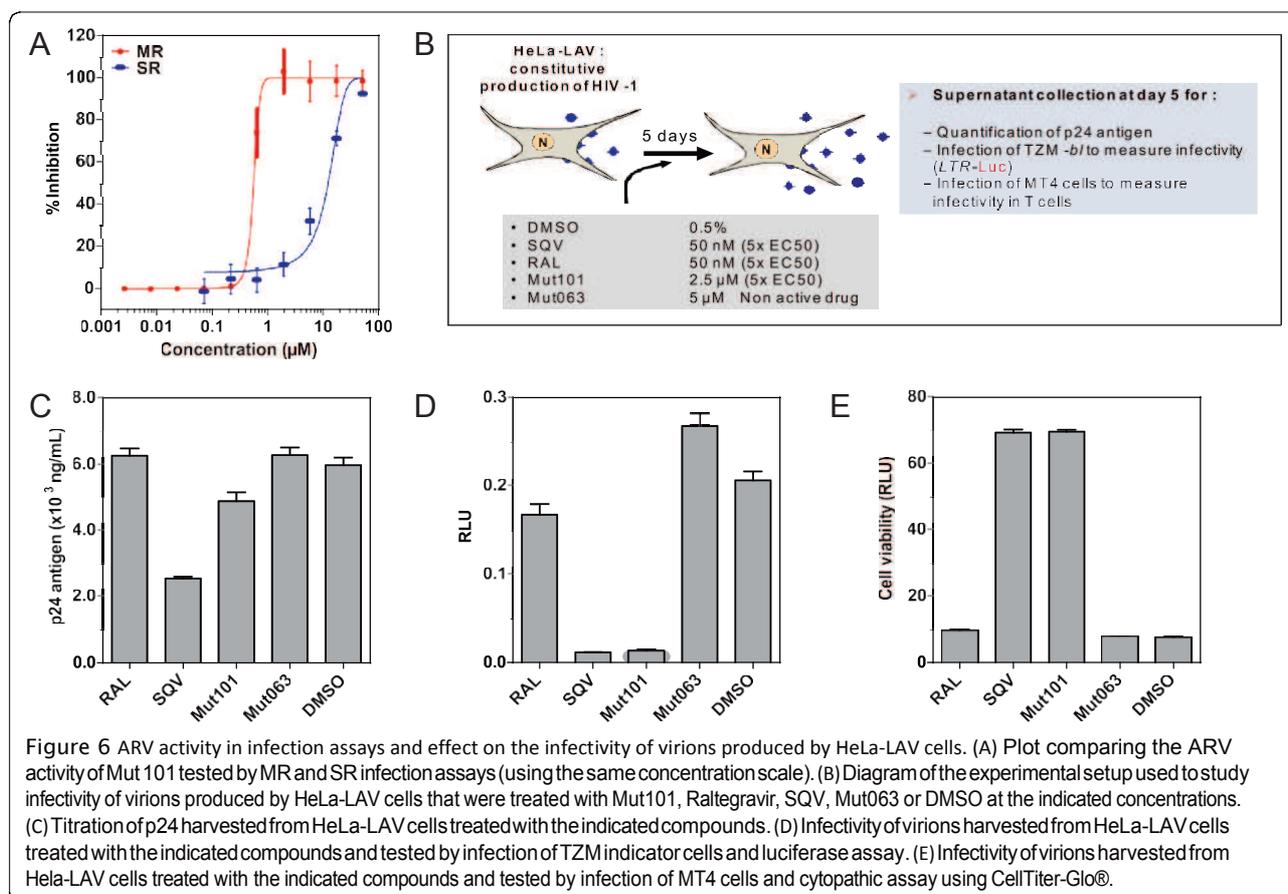
Table 4 Antiviral activities in single-round and multiple-round infection assays

Drug	NL4-3 EC ₅₀ (μM)		SR/MR ratio
	Single-round	Multiple-round	
EFV	0.0012 ± 0.0004	0.0013 ± 0.0002	0.9
RAL	0.0025 ± 0.0003	0.0024 ± 0.0006	1
EVG	0.00042 ± 0.00005	0.00086 ± 0.0004	0.5
NVP	0.041 ± 0.008	0.086 ± 0.012	0.5
AZT	0.0025 ± 0.0003	0.0024 ± 0.0006	0.6
IDV	Inactive	0.036	NA
SQV	Inactive	0.013	NA
Mut029	30 ± 4	3.8 ± 1.6	8
Mut047	37 ± 2	16 ± 7	2.3
Mut049	41 ± 2	2.0 ± 0.1	21
Mut062	30% @50	3.3 ± 1.5	>25
Mut075	23% @50	3.4 ± 1.0	>25
Mut101	9.0 ± 1.5	0.49 ± 0.04	18

EC₅₀ for the ARV activity of Mut101 compound series (tested in SR and MR assays) and the SR/MR ratio compared to the indicated drugs. Data represent the mean of six independent experiments.

treatments resulted in strong virus infectivity defects; viruses produced in the presence of Raltegravir, DMSO or Mut063 had no infectivity defect (Figure 6D). These results were confirmed by determining the cytopathic effect of infected MT4 cells using a CellTiter-Glo® assay (Figure 6E). The infectivity defect was not due to a residual concentration of Mut101 used during virus production since the virus stock was diluted 2000 times, to an inefficient concentration much below its EC₅₀. We can also rule out a virucidal effect of Mut101 on virus particles released in the supernatant as Mut101 was unable to inactivate free virus once released in the supernatant of producing cells. Altogether, these results are strongly in favor of a defect provoked at a post-integration step by Mut101 treatment. This defect is additional to the block at integration detected above by the TOA experiment. Western blot using anti-p24 antibody did not detect any perturbation of Gag maturation and CA p24 content in defective virions or in Mut101-treated HeLa-LAV cell lysates (data not shown).

A post-integration defect promoted by Mut101 treatment requires Mut101 binding to the LEDGF-binding pocket of IN. The post-integration block promoted by Mut101 cannot be explained by impaired IN-LEDGF interaction or the inhibition of IN catalytic activity. It could be suggested that such a post-integration defect might be related to an unknown Mut101 target, in addition to IN. We generated an NL4-3 HIV-1 virus bearing the T174I mutation in the LEDGF-binding pocket of IN to rule out this hypothesis. We (E. Le Rouzic unpublished results) and others [36] have selected the T174I mutation for resistance to IN-LEDGF inhibitors: Mut101 had an EC₅₀ > 50 μM on this mutant compared to an EC₅₀ = 0.49 μM on NL4-3 wt. We used Surface Plasmon Resonance (SPR) to confirm that Mut101 was less able to bind to the mutated IN-CCD T174I than to IN-CCD wt. Mut101 bound to IN-CCD wt with high affinity (K_d = 0.12 μM) in a similar range to the IC₅₀ or AC₅₀ found in HTRF assays for inhibition of the IN-LEDGF interaction or enhancement of the IN-IN interaction, respectively (Figure 7A). Mut101 had no significant binding to the mutated IN-CCD T174I (Figure 7B). HIV-1 NL4-3 wt and the NL4-3 IN T174I mutant virus were produced by HEK293T cell transfection in the presence of Mut101, SQV, Raltegravir, Mut063 or DMSO. Virions were harvested and used to infect MT4 cells (as schematized in Figure 7C); their infectivity was tested using a cytopathic CellTiter-Glo® assay. As shown in Figure 7D, NL4-3 wt virus (blue bars) produced in the presence of Mut101 was inactivated and the viability of MT4 cells infected by this virus was preserved. In contrast, the mutant virus T174I (red bars) was insensitive to Mut101 treatment and MT4 cells were fully infected and



their viability abrogated. Both wt and T174I viruses were sensitive to and inactivated by SQV treatment. Raltegravir treatment during virus production had no effect on either virus; these retained full infectivity which was comparable to that observed after DMSO or Mut063 treatment. These results demonstrate that integrase is indeed the unique target of Mut101 for its ARV activity, both at the integration and post-integration steps of the HIV-1 replication cycle.

Discussion

IN-LEDGF allosteric inhibitors (INLAIs) are a new class of IN inhibitors whose binding site, the LEDGF-binding pocket, is different from the IN catalytic site targeted by INSTIs. In this study we described new IN-LEDGF inhibitors from the family of LEDGINS and TBPQAs. These compounds shared multiple activities with the previously described compounds of this class. These include: inhibition of the IN-LEDGF interaction, weak inhibition of IN strand transfer activity (additive to that of Raltegravir) and even weaker inhibition of IN 3' processing activity, IN conformational change by increased IN-IN interaction that favors higher order oligomerization state of IN (independent of LEDGF, with AC₅₀ similar to the IC₅₀

found for IN-LEDGF inhibition), and a dual mode of ARV activity at both integration and post-integration steps of viral replication. These results define the Mut101 series of compounds like other IN-LEDGF inhibitors as *bona fide* allosteric inhibitors of IN functions. Since both catalytic activities of IN, 3' processing and strand transfer are dependent on the oligomeric state of IN [50], it is likely that the shift of IN dimer toward higher order oligomeric state of IN promoted by Mut101 or BI-D binding, is more detrimental to the strand transfer reaction rather than to the 3' processing activity of IN.

Our co-crystallographic studies with Mut101 bound to IN-CCD allowed us to detect conformational changes resulting from compound binding in the binding site of inhibitors. The structural changes observed when Mut101 is bound to IN confirm and explain the allosteric effect of the IN/LEDGF interaction inhibitor which acts at the post-integration steps. We evidenced a direct correlation between allosteric changes with atomic details and functional effect on IN upon Mut101 binding. Our experiments enabled us to address important questions regarding the unicity or multiplicity of the mechanism of action of these inhibitors, the respective contributions of these inhibitory activities to overall ARV activity, and the specific mode of action of these new ARV agents.

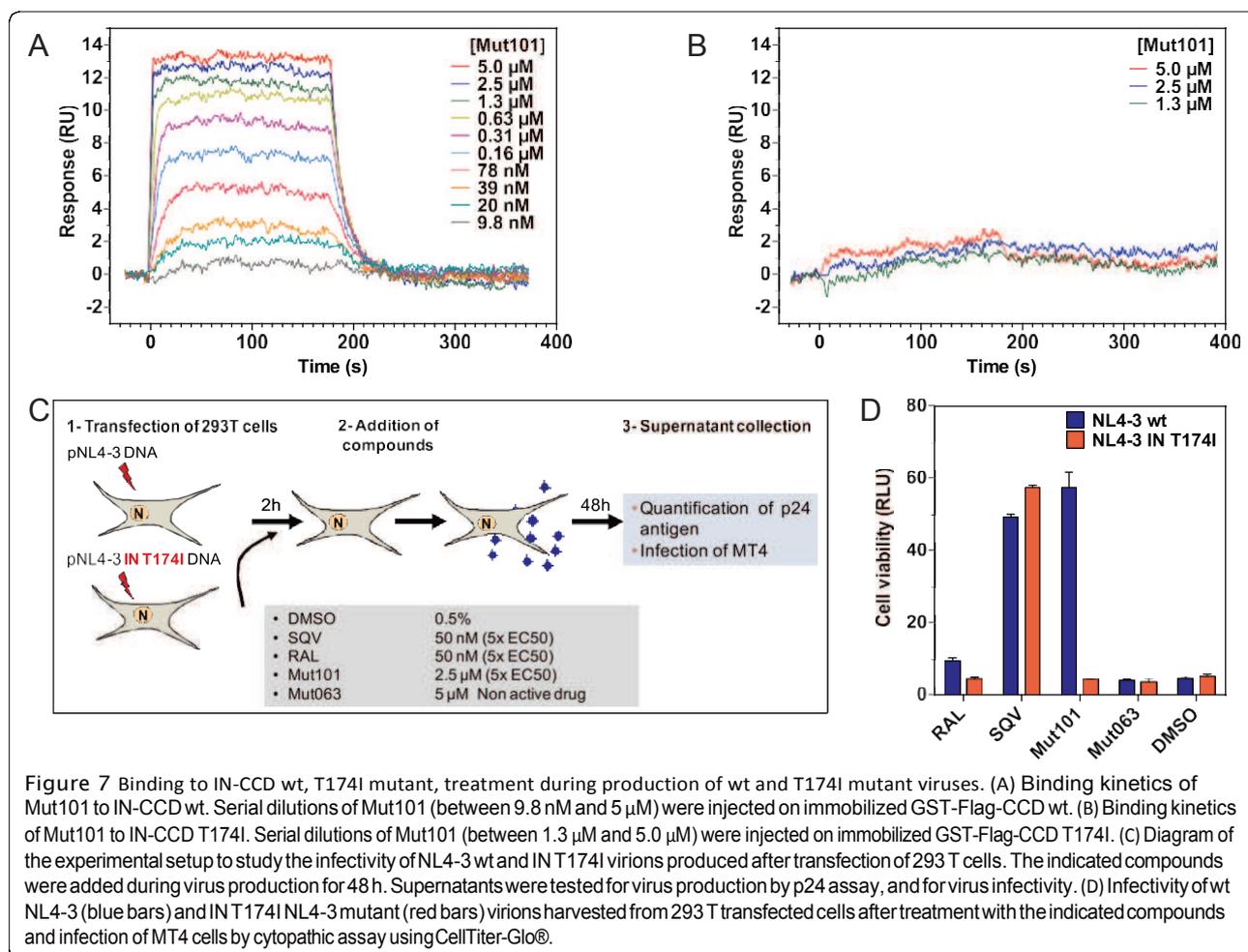


Figure 7 Binding to IN-CCD wt, T174I mutant, treatment during production of wt and T174I mutant viruses. (A) Binding kinetics of Mut101 to IN-CCD wt. Serial dilutions of Mut101 (between 9.8 nM and 5 μM) were injected on immobilized GST-Flag-CCD wt. (B) Binding kinetics of Mut101 to IN-CCD T174I. Serial dilutions of Mut101 (between 1.3 μM and 5.0 μM) were injected on immobilized GST-Flag-CCD T174I. (C) Diagram of the experimental setup to study the infectivity of NL4-3 wt and IN T174I virions produced after transfection of 293 T cells. The indicated compounds were added during virus production for 48 h. Supernatants were tested for virus production by p24 assay, and for virus infectivity. (D) Infectivity of wt NL4-3 (blue bars) and IN T174I NL4-3 mutant (red bars) virions harvested from 293 T transfected cells after treatment with the indicated compounds and infection of MT4 cells by cytopathic assay using CellTiter-Glo®.

Blocking at integration can be explained by the inhibition of IN strand transfer and IN-LEDGF interaction, given the role of LEDGF in the tethering of IN to chromatin during the integration process of HIV-1. The post-integration block promoted by INLAIs is not in line with these activities. This raises the possibility that these compounds have another unrelated target in addition to the LEDGF-binding pocket of IN. We ruled out this hypothesis using a virus mutated in the LEDGF-binding pocket of IN (NL4-3 IN T174I, resistant to Mut101 ARV activity) and demonstrate that IN is indeed the target of this post-integration defect: the lack of Mut101 binding to the IN-CCD T174I correlated with the absence of effect of Mut101 on the production of the NL4-3 IN T174I mutated virus. We conclude that both the integration and post-integration blocks promoted by INLAIs are related to the binding of these compounds to a unique target, the LEDGF-binding pocket of IN. This dual inhibitory activity, at two different steps of the HIV-1 replication cycle through the same viral target, is unprecedented for all classes of ARV drugs.

We investigated the respective contributions of the two mechanisms to the global ARV activity of these compounds. SR infection assays reflect the activity of an ARV compound during an early step of the HIV replication cycle (up to integration), and MR infection assays reflect global ARV activity. We showed that the post-integration inhibition of the HIV-1 replication cycle is the major mechanism contributing to global Mut101 ARV activity. There was no or minimal ARV activity detectable in SR infection assay at the same Mut101 concentration that achieved 100% inhibition of HIV-1 infection in the MR infection assay. A higher concentration of Mut101 was required to detect ARV activity in the SR assay since its EC₅₀ in this format (9 μM) was 18 times higher than its EC₅₀ in MR infection assay (0.49 μM). TOA experiments used a Mut101 concentration (25 μM) that was high enough to permit 100% of ARV activity in the SR infection assay. Our study demonstrates that Mut101 and the other INLAIs of this series are not acting mainly as inhibitors of HIV-1 integration. This is in contrast to early studies

reported on LEDGINs, based on MR infection experiments performed at saturating inhibitor concentration, that suggested they act as integration inhibitors [18]. HIV-1 integrase is the unique target of Mut101 for its ARV activity. However, the major action of Mut101 and other related INLAIs is as post-integration inhibitors producing defective infectious HIV-1 virions.

Mut101 displays weak activity at early stage integration and potent activity at late stage production of defective virions. We then explored how a compound acting on a unique target (IN) and on a unique binding site (the LEDGF-binding pocket), displays such a difference between its potency on two ARV activities. The ARV activity of Mut101 series INLAIs and their inhibition of the IN-LEDGF interaction are clearly linked. There is a tight correlation between their action on IN-LEDGF interaction inhibition and their activity on IN-IN interaction enhancement and IN conformational change. Further studies are required to resolve this issue. However, some clues are provided by Wang *et al.*, who studied the ARV activity of a tBPQA compound (racemic BI-D) on wt and LEDGF KO mouse cells infected with a VSV-G-pseudotyped HIV-1 luciferase virus in SR infection experiments [40]. The EC₅₀ of racemic BI-D ARV activity was between 2.4 μM and 2.9 μM when tested on wt cells but between 0.16 μM and 0.20 μM (15 to 18 times lower) on LEDGF KO cells, a result not significantly altered by HRP2 disruption. In contrast, the EC₅₀ of Raltegravir was similar in each cell type. The authors suggest that LEDGF, present in wt cells but not in LEDGF KO cells, can compete with BI-D for binding to the LEDGF-binding pocket of IN. In the presence of a LEDGF competitor in wt cells, the concentrations of BI-D required to achieve similar ARV activity are higher than when LEDGF is absent in KO cells. Strikingly, we found that the EC₅₀ of BI-D ARV activity on MT4 human cells infected with HIV-1 NL4-3 was 2.4 μM ± 0.5 in SR and 0.17 μM ± 0.03 in MR infection assays. This is very similar to the result found by Wang *et al.* (Table 5), although they worked with mouse cells and we worked with human cells. The data strongly suggest that a mechanism similar to that observed by Wang *et al.* (LEDGF competition in SR assay and no competition by LEDGF in MR assay), could explain the

difference in ARV activity we found for INLAIs assayed in SR and MR infection assays. These data, and our *in vitro* data showing that LEDGF can compete with Mut101 for binding to IN, support the model illustrated in Figure 8 concerning the considerable difference in the potency of INLAIs between their low ARV activity at integration and their much higher activity inhibiting the production of infectious particles at post-integration stages, although both activities are due to the occupation of the same binding site on IN. The inhibition of HIV-1 integration by INLAIs, measured in SR infection assays, is based on the impairment of the IN-LEDGF interaction and allosteric inhibition of IN. This takes place in the nucleus of HIV-1 target cells. In this cellular compartment LEDGF is abundant and can compete effectively with INLAIs for binding to IN, limiting ARV activity of these inhibitors at this stage. In contrast, the activity of INLAIs at the virus production stage, as measured in MR assays, takes place in the cytoplasm of virus-producer cells after integration. LEDGF, a chromatin-bound nuclear protein, is absent from this cellular compartment and cannot compete with INLAIs for binding to IN or to the Pol polyprotein containing IN [42]. INLAIs are able to target both the IN associated with incoming virions at the step of integration in target cells (in the nucleus, in the presence of competing LEDGF) and the newly synthesized IN in producer cells (associated with progeny virions in the cytoplasm or at the plasma membrane, in the absence of LEDGF). This model suggests that the activity of a protein-protein interaction inhibitor (in this case, concerning the interaction between a viral and a cellular protein) is governed not only by its intrinsic affinity for its target, but also by the cellular compartment in which it is acting. It is the presence or absence of the partner protein of the inhibitor target that could, by competitive binding, negatively affect the level of inhibitor activity.

The activity of Mut101 and other INLAIs, at the step of integration, may be explained by impairment of IN-LEDGF interaction and their allosteric inhibitory effect on IN strand transfer catalytic activity. However, we need to understand what molecular mode of action of these compounds explains the post-integration block. Gag maturation and CA composition of defective virions produced in the presence of these compounds was normal [42,43] (E. Le Rouzic unpublished results), suggesting that there is no putative effect on maturation of the Gag precursor. We also know that Mut101 does not inhibit viral protease (D. Bonnard unpublished data). A post-integration stage defect could be related to IN conformational change resulting from compound binding to the LEDGF-binding pocket and IN-IN interaction enhancement ([42,43] and this study). We showed, for the first time, that INLAIs promoted long range conformational change when they bind to IN-CCD, affecting

Table 5 BI-D anti-retroviral activity EC₅₀

	Human cells	
	Single-round/MT4	Multiple-round/MT4
This study	2.4 ± 0.5 μM	0.17 ± 0.03 μM
	Mouse cells	
Wang <i>et al.</i> study [40]	LEDGF +/- WT cells	LEDGF -/- KO cells
	2.4 to 2.9 μM	0.16 to 0.20 μM

A comparison of BI-D ARV activity (EC₅₀) assayed in this study (using MT4 human cells) and results reported by Wang *et al.* (using LEDGF WT and KO mouse cells).

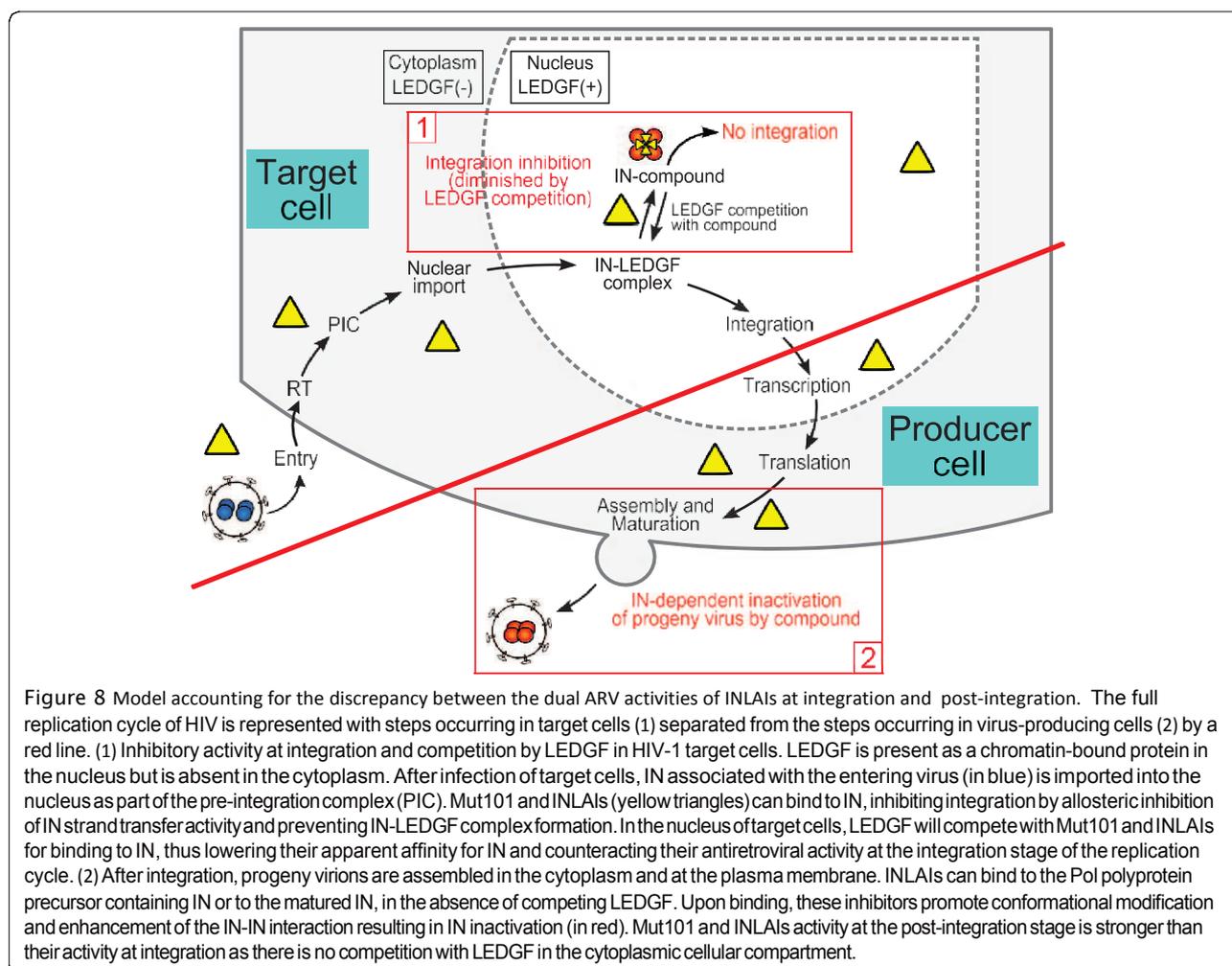


Figure 8 Model accounting for the discrepancy between the dual ARV activities of INLAIs at integration and post-integration. The full replication cycle of HIV is represented with steps occurring in target cells (1) separated from the steps occurring in virus-producing cells (2) by a red line. (1) Inhibitory activity at integration and competition by LEDGF in HIV-1 target cells. LEDGF is present as a chromatin-bound protein in the nucleus but is absent in the cytoplasm. After infection of target cells, IN associated with the entering virus (in blue) is imported into the nucleus as part of the pre-integration complex (PIC). Mut101 and INLAIs (yellow triangles) can bind to IN, inhibiting integration by allosteric inhibition of IN strand transfer activity and preventing IN-LEDGF complex formation. In the nucleus of target cells, LEDGF will compete with Mut101 and INLAIs for binding to IN, thus lowering their apparent affinity for IN and counteracting their antiretroviral activity at the integration stage of the replication cycle. (2) After integration, progeny virions are assembled in the cytoplasm and at the plasma membrane. INLAIs can bind to the Pol polyprotein precursor containing IN or to the matured IN, in the absence of competing LEDGF. Upon binding, these inhibitors promote conformational modification and enhancement of the IN-IN interaction resulting in IN inactivation (in red). Mut101 and INLAIs activity at the post-integration stage is stronger than their activity at integration as there is no competition with LEDGF in the cytoplasmic cellular compartment.

residues far away from the compound binding site. Such IN conformational change could negatively affect the formation of the stable synaptic complex (SSC) [37], or influence the currently undefined roles of IN during late stages in the HIV-1 replication cycle [51]. Interestingly, it was lately reported [42-45] that treatment by IN-LEDGF allosteric inhibitors during virus production resulted in a defect in virion morphology with eccentric electron-dense HIV core. Further work is required to answer these questions and defective viruses produced in the presence of Mut101 could be valuable tools for these studies.

The LEDGF-binding pocket lies at the dimeric interface of IN, a region crucial for the formation of an active oligomerization state of IN required for its enzymatic activity and specificity [52-54]. INLAIs make contacts to both subunits of an IN dimer and promote IN conformational change toward inactive oligomers. These inhibitors should therefore be considered as interfacial inhibitors that bind selectively to macromolecular machine interfaces and often promote allosteric effects [55].

Interestingly, INSTIs that bind at the interface of the IN-DNA-Mg²⁺ complex [2] are also considered as archetypal interfacial inhibitors [55].

Conclusion

The dual mode of action of Mut101 compound series, at two different steps of the HIV replication cycle, is unique and unprecedented in all classes of ARV drugs. This could confer a great advantage to this class of ARV compounds from a therapeutic point of view, provided that clinically efficient concentrations can be reached to inhibit also virus replication at integration. The absence of antagonism between Mut101 compounds and INSTIs or the other classes of drugs currently on the market supports their potential for future ARV therapy.

Several acronyms have been proposed for this class of compounds: LEDGIN [18], NCINI [36] and ALLINI [37] have been suggested to underline their mode of action either as LEDGF-IN inhibitors or as Allosteric IN inhibitors. We would like to propose the acronym of INLAI, standing for 'IN-LEDGF Allosteric Inhibitor'.

This takes into account both the importance of their interference with LEDGF binding to IN and their powerful allosteric inhibitory activity on IN. Our acronym links both activities in the mode of action and highlights that the binding site of these compounds on IN is the LEDGF-binding pocket.

Methods

Compound synthesis

Mut029, Mut047, Mut049, Mut062, Mut063, Mut075, and Mut101 compounds were prepared as described in WO2012/140243A1, according to examples 20, 15, 2, 17, 9, 18 and 26, respectively [33]. Details for compound synthesis are given in the Additional file 1. Racemic BI-D was prepared as described in WO2009/062285A1, according to example 41 [20].

Virology

Reference compounds

Control compounds such as Saquinavir (SQV), Indinavir (IDV), Nevirapine (NVP), Efavirenz (EFV) and AZT were obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Raltegravir (RAL) and Elvitegravir (EVG) were purchased from Selleck Chemicals.

Cell culture

MT-4, TZM-bl and HeLa-LAV cells were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. MT-4 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum and 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen) to obtain RPMI-complete medium. HeLa-LAV, TZM-bl and 293 T cells (ATCC, CRL-11268) were grown in DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics. TZM-bl cells are a HeLa modified cell line containing separately integrated copies of the luciferase and β-galactosidase genes under control of the HIV-1 promoter.

Virus strains and recombinant HIV-1 molecular clones

HIV-1 NL4-3 and NL4-3Δ*env*-luc molecular clones were obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. The SpeI-SalI fragment from pNL4-3 containing the full *pol* gene was cloned into the pUC18 plasmid. *In vitro* mutagenesis was performed with the *Pfu* Turbo (Stratagene) and specific sets of primers to engineer the RT double mutant K103N/Y181C. The mutated fragment was validated by sequencing (Eurofins) and cloned back into pNL4-3 to generate a HIV-1 mutant molecular clone (used as a NNRTI-resistant virus). The molecular clone containing L10R/M46I/L63P/V82T/I84V mutations within the PR-coding region [56] was used as a PR-resistant virus (PI); the clone with M41L/D67N/T69N/K70R/T215F/K219E within the RT-coding

region [57] was used as a NRTI-resistant virus; the clone with M41L/D67N/K103N/M184V/L210W/T215Y within the RT-coding region [57] was used as a NRTI and NNRTI-resistant virus (Multi-drug in this study). PI, NRTIs and Multi-drug resistant clones were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program. The molecular clone containing G140S/Q148H within the IN-coding region obtained from J-F Mouscadet [58] was used as the INSTI-resistant virus.

Viral stock

293 T (2.2 × 10⁶ cells) were transfected with 6 µg pNL4-3 proviral plasmids (wild-type or drug resistant) using X-tremeGENE 9 reagent (Roche). Cells were washed 24 h later and cell supernatants were collected 48 h post-transfection and stored at -80°C. Single-round viral stocks were produced by co-transfecting pNL4-3Δ*env* with VSV-G envelope expression vector. Supernatants were collected 2 days after transfection. All viral stocks were quantified for p24 antigen using the Alliance HIV-1 p24 Antigen ELISA (PerkinElmer) and titrated to measure the quantity of infectious particles per mL by infecting TZM-bl indicator cells.

Antiviral assay in MT-4 cells

MT-4 cells growing exponentially at the density of 10⁶/mL were infected with HIV-1 strain NL4-3 at a MOI (multiplicity of infection) of 0.001 for 2 h. The cells were washed with PBS and aliquoted, using 100 µL fresh complete RPMI, into 96-well white plates (Corning) in the presence of different concentrations of compounds. The effective concentration of compound required to inhibit 50% (EC₅₀) of HIV-1 replication was determined after 5 days using the CellTiter-Glo® luminescent reagent (Promega) to quantify cell viability.

Replication-defective-HIV assay

MT-4 cells (growing exponentially at the density of 10⁶/mL) were infected with VSV-G-pseudotyped NL4-3Δ*env*-luc at a MOI of 0.0001 for 90 minutes. The cells were washed with PBS and aliquoted, using 100 µL fresh complete RPMI, into 96-well white plates (Corning) in the presence of different concentrations of compounds. Luciferase expression was quantified after two days using the One-Glo™ luciferase assay (Promega).

Cytotoxicity assays

Growth inhibition was monitored in a proliferating human T-cell line (MT-4) with different concentrations of compounds. ATP levels were quantified using the CellTiter-Glo® luminescent reagent (Promega) to measure the ability of a compound to inhibit cell growth, an indication of the compound's cytotoxicity. Cytotoxicity was evaluated at either day 2 or day 5.

Time-of-addition experiment

MT-4 cells in a 96-well microtiter plate (10^5 cells per well) were infected with pseudotyped HIV-1 NL4-3 strain at a MOI of 0.001. Compounds were added to single-round infection assays at different time points after infection (0, 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 24 h). RAL, NVP and Mut101 were added at 80 nM, 2 μ M and 25 μ M, respectively. This corresponded to between three and ten times their EC_{50} as determined by a drug susceptibility assay (CT-Glo).

Quantification of viral cDNA by real-time PCR

Prior to infection, viral stocks were treated 1 h at 37°C with 100 U per mL of DNaseI (Roche Applied Science). MT4 cells (6×10^6) were infected with virus at MOI = 0.001. At 7 h, 24 h and 48 h post-infection, cells were harvested, washed twice in PBS and DNA was extracted using the QIAamp Blood DNA Minikit (Qiagen). Quantifications of viral DNA were performed by real-time PCR using the LightCycler 480 system (Roche Applied Science). Primers, probes, and PCR run conditions were described previously [59]. The copy number of HIV-1 late reverse transcription product (LRT) was determined using standard curves obtained by amplification of cloned DNA containing the matched sequences. The copy number of integrated HIV-1 DNA was determined in reference to a standard curve generated by concomitant two-stage PCR amplification of a serial dilution of the standard HeLa HIVR7-Neo cell DNA [59]. Copy numbers of each viral form were normalized with the number of cells obtained by the quantification by PCR of the β -globin gene according to the manufacturer instructions (Roche Applied Science).

Molecular biology and biochemistry

Constructions of epitope-tagged proteins

The His₆-LEDGF plasmid has been previously described [60]. The plasmid encoding GST-Flag-IBD/LEDGF was constructed by cloning the LEDGF DNA sequence (encoding residues 342 to 507) in fusion with the Flag epitope into pGEX-2T (GE Healthcare). His₆-IN plasmid corresponds to pINSD.His and has been previously described [61]. The IN A128T mutant was generated by site-directed mutagenesis from pINSD.His. The full length Flag-tagged integrase sequence from NL4-3 was PCR amplified and cloned between the BamHI and XhoI restriction sites of a pGEX-6P1 vector (GE Healthcare) to generate the expression plasmid GST-Flag-IN. His-CCD and GST-Flag-CCD were obtained by cloning the integrase region (residues 50 to 202, encoding the catalytic core domain) from pINSD.His. Sol [62] into pET15b and pGEX-2T-Flag, respectively. CCD contains the F185K mutation which greatly improves the solubility of the recombinant protein.

The CCD T174I mutation was introduced into the His-CCD plasmid by site-directed mutagenesis.

Purification of recombinant proteins

Frozen cells pellets from one liter culture were resuspended in 3.5 mL of integrase buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 1 M NaCl, 7 mM CHAPS, 5 mM MgCl₂, 2 mM β -mercaptoethanol, 10% glycerol) (for full length integrase) or the same buffer in a two-fold water dilution (for integrase CCD), containing Complete™ protease inhibitor cocktail (Roche) and benzonase (Sigma). Cells were disrupted using 25 g - 30 g, 150–212 μ m glass beads (Sigma) and vortexed at 4°C for 10 min. Glass beads were washed three times with 15 mL extraction buffer and whole cell lysate was centrifuged at 109,000 g (R_{max}) for 1 h at 4°C in a Beckman XL80K ultracentrifuge.

His₆-tagged IN wt or A128T, or His₆-tagged IN-CCD lysate was loaded at 3 mL/min on a 5 mL His-Trap FF crude column (GE Healthcare) previously equilibrated with integrase buffer or CCD buffer, respectively, containing 20 mM imidazole. Samples were washed until OD_{280nm} returned to baseline and bound proteins were then eluted using a 20 to 500 mM imidazole gradient over 20 column volumes. Pooled fractions were concentrated to 2.5 mL using Amicon Ultra 15™ 10 K centrifugal filter devices (Millipore) at 4,000 g and 4°C. Concentrated protein was loaded on a Superdex 200 16/600 PG column (for full length IN) or a Superdex 75 16/600 PG column (for IN-CCD) (GE Healthcare), previously equilibrated with integrase buffer at 4°C. Chromatography was performed at 4°C. The presence of His₆-Tag IN/CCD in collected fractions was assessed by electrophoresis on NuPAGE Bis-Tris 10% acrylamide gels with MES as the electrophoresis buffer (Invitrogen). Proteins were stained using Imperial Protein Stain™ (Thermo Scientific Pierce). Pooled fractions from Superdex200 or Superdex75 separation were concentrated and stored at -80°C until further use. GST-tagged Flag-CCD and GST-tagged Flag-IBD lysates were loaded at 0.25 mL/min on a 20 mL Glutathione Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) column. Bound proteins were eluted using integrase CCD buffer with 20 mM reduced glutathione. Purification was completed as described above. Flag-IN was prepared from a GST-Flag-IN fusion protein using the pGEX-6P expression system (GE Healthcare). After adsorption to the Glutathione Sepharose 4 Fast Flow column, protein corresponding to the 1 liter culture extract was digested by 250 units of PreScission Protease (GE Healthcare) for 16 hours at 4°C. Cleaved protein was eluted by restarting the buffer flow over the column. Purification was carried out by gel filtration on Superdex 200, as described above. rGST was purified on Glutathione Sepharose 4 Fast Flow and Superdex 75 16/600 PG columns as described above but using a PBS buffer.

HTRF®-based CCD-IBD interaction assay

All HTRF® conjugated monoclonal antibodies were purchased from Cisbio Bioassays. IN-CCD/LEDGF-IBD HTRF® assay was performed in 384-well low volume black polystyrene plates (Corning) in CCD-IBD assay buffer (25 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.4 M KF, 0.1% bovine serum albumin, 1 mM DTT). 2 µL of 3-fold serial dilutions of inhibitory compound in 25% DMSO were preincubated for 30 min at room temperature with 8 µL of IN-CCD mixture (75 nM His₆-IN-CCD, 17 nM XL₆₆₅-conjugated anti-His₆ monoclonal antibody). Then, 10 µL of LEDGF-IBD mixture (20 nM GST-Flag-LEDGF-IBD, 1.8 nM Europium cryptate-labelled anti-GST monoclonal antibody) were added and the plate was incubated for 2.5 h at room temperature before reading the time-resolved fluorescence in a PHERAstar Plus (BMG Labtech) with HTRF module (excitation at 337 nm, dual emission at 620 nm and 667 nm). The HTRF ratio was converted to % inhibition and analyzed by fitting with a sigmoidal dose-response equation with Hill slope to determine the compound IC₅₀.

HTRF®-based IN-LEDGF interaction assay

IN-LEDGF HTRF® assay was performed in 384-well low volume black polystyrene plates (Corning) using IN-LEDGF assay buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.4 M KF, 0.1% Igepal CA-630, 0.1% bovine serum albumin, 1 mM DTT). 2 µL of 3-fold serial dilutions of inhibitory compound in 25% DMSO were preincubated for 30 min at room temperature with 8 µL of IN mixture (50 nM Flag-tagged IN, 17 nM XL₆₆₅-conjugated anti-Flag M2 monoclonal antibody). 10 µL of LEDGF mixture (60 nM His₆-tagged LEDGF/p75, 1.5 nM Terbium cryptate-labelled anti-His₆ monoclonal) were added and the plate was incubated for 2.5 h at room temperature before reading the time-resolved fluorescence in a PHERAstar Plus with HTRF module (excitation at 337 nm, dual emission at 620 nm and 667 nm). The HTRF ratio was converted to % inhibition and analyzed by fitting a sigmoidal dose-response equation with Hill slope to determine the IC₅₀ of the compound.

For the LEDGF competition assay, an IN-LEDGF assay was performed with various concentrations of His₆-LEDGF in the LEDGF mixture (from 15 nM to 0.96 µM).

HTRF®-based IN multimerization assay

IN-IN HTRF® assay was performed in 384-well low volume black polystyrene plates (Corning). 2 µL of 3-fold serial dilutions of inhibitory compound in 25% DMSO were preincubated for 30 min at room temperature with 4 µL of 125 nM Flag-IN dilution. 4 µL of 125 nM His₆-IN were added and the plate was incubated for 3 h at room temperature to allow IN subunit exchange

and multimerization. This step was performed in IN2 buffer (25 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.005% Tween-20, 0.1% bovine serum albumin, 1 mM DTT). 10 µL of revelation mixture (1.1 nM Europium cryptate-labelled monoclonal anti-Flag M2 antibody and 13 nM XL₆₆₅-labelled anti-His₆ monoclonal antibody in IN2 buffer supplemented with 0.8 M KF) were added and the plate was incubated for 2 h at room temperature before reading the time-resolved fluorescence in a PHERAstar Plus with HTRF module (excitation at 337 nm, dual emission at 620 nm and 667 nm). The HTRF ratio was converted to % activation and analyzed by fitting a sigmoidal dose-response equation with Hill slope to determine the AC₅₀ of the compound and the activation plateau.

IN strand transfer ELISA assay

IN strand transfer ELISA assay has been adapted from [63]. The strand transfer reaction was performed in 96-well V bottom polypropylene microplates (Greiner Bio-One) containing 4 µL of 3-fold serial dilutions of compound or 25% DMSO. 16 µL of IN mixture (20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.50 µM His₆-IN) was added. After a 15 min preincubation, 20 µL of substrate oligonucleotide mixture (0.20 µM Biotin-LTR preprocessed donor DNA, 0.20 µM Digoxigenin (DIG)-Target DNA) was added and the plate was incubated for 2 h at 37°C. The reaction was stopped by addition of 60 µL stop mixture (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.4 M NaCl, 10 mM Na₂EDTA, 0.1 mg/mL salmon sperm DNA) and the volume transferred to Reacti-Bind high-binding capacity streptavidin-coated white plates (Thermo Scientific Pierce). After 1 h incubation at room temperature under gentle shaking, integrase and unjoined DNA were removed by three washes with 200 µL wash solution 1 (30 mM NaOH, 0.2 M NaCl, 1 mM Na₂EDTA). 100 µL of 2000-fold diluted HRP-conjugated anti-DIG Fab (Roche Applied Science) was added and the plate was incubated for 1 h at 37°C. Unbound antibody was removed with wash solution 2 (PBS pH 7.4, 0.05% Tween-20, 0.1% bovine serum albumin), 100 µL of SuperSignal Femto ELISA substrate (Thermo Scientific Pierce) was added and chemiluminescence was immediately read in a PHERAstar Plus with LUM-plus module. The signal, converted to % inhibition, was analyzed by fitting a sigmoidal dose-response curve to determine IC₅₀ and the inhibition plateau.

IN 3' processing and strand transfer radioactive assays

Sequences of the different oligonucleotides (ODN) substrates are U5B: 5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3', U5A: 5'-ACTGCTAGAGATTTTCCACAC-3' and U5B-2: 5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCA-3'. ODNs were purchased from Eurogentec and further purified by elec-

trophoresis in a denaturing 16% acrylamide/urea gel. For activity assays, ODNs (U5B and U5B-2) were radiolabelled with T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and γ [$^{32}\text{-P}$]ATP (3000 Ci/mmol) (Amersham), and purified on a Sephadex G-10 column (GE Healthcare). Double-stranded ODNs (U5B with U5A and U5B-2 with U5A used for 3'-processing and strand transfer reactions, respectively) were obtained by mixing equimolar amounts of complementary strands in the presence of 100 mM NaCl.

IN activity assays – 3'-processing, strand transfer – were carried out at 37°C with the full-length HIV-1 IN, in a buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.2), 1 mM DTT, 7.5 mM MgCl₂ in the presence of 6.25 nM DNA (3'-processing) or 12.5 nM DNA (strand transfer) as described previously [64]. For negative control, 100 mM Na₂EDTA was added to the reaction before incubation. Products were separated by electrophoresis in denaturing 16% acrylamide/urea gels. Gels were analysed with a Molecular Dynamics STORM phosphoimager and quantified with ImageQuant™ 4.1 software.

Size exclusion chromatography (SEC) experiments with IN liganded with Mut101 and BI-D compounds

SEC was performed with a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) using a flow-rate of 0.4 mL/min in buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.5, 1 M NaCl, 7 mM CHAPS, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10% glycerol at room temperature. His₆-IN wt (21 μM) or His₆-IN A128T (40 μM) was incubated for 10 min with 100 μM BI-D or Mut101 before injection on the column. Protein elution was monitored at 280 nm.

Biacore experiments

Experiments were carried out using a Biacore 3000 instrument (GE Healthcare) at 25°C. An anti-GST antibody (GST Capture Kit, GE Healthcare) was immobilized on two flow-cells of a CM5 sensor chip by amine coupling according to the recommendations of the manufacturer. GST-Flag tagged IN CCD proteins (wild type and T174I mutant) at 68 μg/mL in HBS-EP buffer (GE Healthcare) were captured on one flow-cell (8 min injection at 10 μL/min) while recombinant GST (60 μg/mL in HBS-EP buffer, 8 min injection at 10 μL/min) was injected on the other flow-cell and used as a reference. Kinetics experiments with Mut101 were carried out at 60 μL/min with a 3 min injection of each dilution of the compound in HBS-EP followed by 10 min dissociation. Sensorgrams were evaluated using BiaEvaluation 3.2 software.

Structural studies

Crystallization was performed by the hanging-drop vapor-diffusion method at 297 K in 24-well plates. The catalytic domain (CCD) of HIV-1 IN with mutation F185K was expressed and purified as previously described [62]. Prior

to any crystallization experiment, the protein was simultaneously dialyzed and concentrated at 277 K with an Amicon Ultra-10 device (Millipore) equipped with a 10 kDa cut-off dialysis membrane. The dialysis solution was 50 mM MES-NaOH pH 5.5, 50 mM NaCl and 5 mM DTT. The protein was concentrated to between 3 mg/mL and 5 mg/mL.

Each hanging-drop consisted of 3 μL protein solution and 3 μL reservoir solution, with 500 μL reservoir solution in the well. Initial screening was carried out using Qiagen kits (Classics & JCSG+) and positive hits were then optimized. The optimized reservoir solution consisted of 1.16-1.36 M ammonium sulfate, 50 mM sodium cacodylate-HCl pH 6.5. The crystals grew to approximate dimensions of 0.2 x 0.2 x 0.4 mm within one week. They were soaked with the Mut101 ligand for 5 days before data collection by adding a 10 mM stock solution of the inhibitor to the drop. The crystals were plunged in oil (FOMBLIN Y LVAC 14/6 from Aldrich) for a few seconds and cryo-cooled in a stream of liquid nitrogen at 100 K. All data were collected at a temperature of 100 K and processed with XDS [65]. All diffraction data were collected using a Pilatus 2 M detector on beamline X06DA (PXIII) at the Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland. Structure determination was carried out using the CCP4 suite of programs [66]. The structures of the integrase, both in complex with the Mut101 inhibitor or not, were determined by molecular replacement using the program MOLREP [67] and PDB entry 1BHL [68] as the starting model. The models were built manually using the program Coot [69] and refined with the program REFMAC [70]. Arp/Warp [71] was used for the automatic ligand [72] and water molecule fitting. Structures and structure factors have been deposited in the PDB with codes 4LH4 (IN CCD) and 4LH5 (IN CCD with Mut101 inhibitor).

All experiments have been performed under Authorization Number 5606 CA-I, assigned by the French Ministry of Research for work with genetically modified organisms.

Additional files

Additional file 1: Additional methods, figures and tables.

Additional file 2: The movie was generated with PyMOL [73]. The intermediate structures between the initial and final state were generated using the morphing option in Pymol. The two IN monomers are colored in red and gold. The magnesium ion is represented as a green sphere and the coordinating residues of the magnesium and in the Mut101 pocket are represented in sticks. The solvent accessible surface coloring is in red and gold for the carbon atom of the corresponding monomer with the nitrogen in blue, the oxygen in red and sulfur in yellow. Mut101 is represented in cyan.

Competing interests

ELR, DB, SC, JMB, FC, FLS, JN, RBea, CA, JB, SV, BL, FM, and RBen declare that they are full time employees of Biodim-Mutabilis. SEil, MR, NL, OD, ED, AS, AZ, and SEMi declare that they have no competing interests.

Authors' contribution

ELR, JN and RBea generated plasmid constructs, viruses and virus infected cells and conducted all virology tests. ELR, SEmi, AS, AZ, FM and RBen designed the studies of antiretrovirals and the selection of resistant mutant viruses. SEmi and CA designed and performed the qPCR studies. ELR designed figures and helped to draft the manuscript. DB designed and performed HTRF and *in vitro* activity studies, designed figures and helped to draft the manuscript. OD designed and performed the radioactive IN activity studies. JMB designed and performed the preparation and purification of recombinant proteins, size exclusion chromatography and Biacore SPR studies, and helped to draft the manuscript. SC designed and conducted compound synthesis and studies with BL, FC, FLS, JB and SV. MR designed the co-crystallization and structural studies and performed these with SEil. NL, FM and RBen designed and coordinated the full study and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Stéphane Huguet for support, Clarisse Berlioz-Torrent for productive discussions, Aurélie Simon for assistance in virology, and the NIH AIDS research repository for reagents. EU FP7 provided financial support under the HIVINNOV consortium, grant agreement 305137. Marc Ruff team was supported by grants from the CNRS, the INSERM, SIDACTION, the French National Agency for Research against AIDS (ANRS), the SPINE 2 European Project (FP6 Contract Nu QLG2-CT-2002-00988 and 031220), the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI, ANR-10-INSB-05-01) and Instruct, part of the European Strategy Forum on Research Infrastructure (ESFRI) supported by national members subscription. We also thank the Swiss Light Source (Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland) where X-ray data collections were performed.

Author details

¹Biodim Mutabilis, Romainville 93230, France. ²IGBMC, Inserm, CNRS, Université de Strasbourg, Illkirch 67404, France. ³Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Paris 75014, France. ⁴LBPA, ENS Cachan, CNRS, Cachan, France. ⁵CNRS UMR7212, Inserm U944, Université Paris Diderot, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, France.

Received: 4 July 2013 Accepted: 15 November 2013
Published: 21 November 2013

References

1. Nguyen BY, Isaacs RD, Tepler H, Leavitt RY, Sklar P, Iwamoto M, Wenning LA, Miller MD, Chen J, Kemp R, *et al*: Raltegravir: the first HIV-1 integrase strand transfer inhibitor in the HIV armamentarium. *Ann N Y Acad Sci* 2011, **1222**:83-89.
2. Hare S, Gupta SS, Valkov E, Engelman A, Cherepanov P: Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 2010, **464**:232-236.
3. Mouscadet JF, Delelis O, Marcelin AG, Tchertanov L: Resistance to HIV-1 integrase inhibitors: a structural perspective. *Drug Resist Updat* 2010, **13**:139-150.
4. Quashie PK, Mesplede T, Wainberg MA: Evolution of HIV integrase resistance mutations. *Curr Opin Infect Dis* 2013, **26**:43-49.
5. Hare S, Smith SJ, Métifiot M, Jaxa-Chamiec A, Pommier Y, Hughes SH, Cherepanov P: Structural and functional analyses of the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir (S/GSK1349572). *Mol Pharmacol* 2011, **80**:565-572.
6. Mesplede T, Quashie PK, Osman N, Han Y, Singhroy DN, Lie Y, Petropoulos CJ, Huang W, Wainberg MA: Viral fitness cost prevents HIV-1 from evading dolutegravir drug pressure. *Retrovirology* 2013, **10**:22.
7. Cherepanov P, Maertens G, Proost P, Devreese B, Van Beeumen J, Engelborghs Y, De Clercq E, Debyser Z: HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem* 2003, **278**:372-381.
8. Legrain P, Rain J-C, Benarous R, Emiliani S, Berlioz-Torrent C, Blot G: *Protein-protein interactions in human immunodeficiency virus*. US patent 7,763,254; US Provisional 2001-333346P Nov 26 (2001); PCT/EP02/13868 Nov 26 (2002). International publication number WO 03/046176 International publication date 5 June 2003.
9. Engelman A, Cherepanov P: The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog* 2008, **4**:e1000046.
10. Busschots K, Vercammen J, Emiliani S, Benarous R, Engelborghs Y, Christ F, Debyser Z: The interaction of LEDGF/p75 with integrase is lentivirus-specific and promotes DNA binding. *J Biol Chem* 2005, **280**:17841-17847.
11. Cherepanov P, Ambrosio ALB, Rahman S, Ellenberger T, Engelman A: Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:17308-17313.
12. Hare S, Shun M-C, Gupta SS, Valkov E, Engelman A, Cherepanov P: A novel co-crystal structure affords the design of gain-of-function lentiviral integrase mutants in the presence of modified PSIP1/LEDGF/p75. *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000259.
13. Llano M, Saenz DT, Meehan A, Wongthida P, Peretz M, Walker WH, Teo W, Poeschla EM: An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science* 2006, **314**:461-464.
14. Shun MC, Raghavendra NK, Vandegraaff N, Daigle JE, Hughes S, Kellam P, Cherepanov P, Engelman A: LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes Dev* 2007, **21**:1767-1778.
15. Ciuffi A, Llano M, Poeschla E, Hoffmann C, Leipzig J, Shinn P, Ecker JR, Bushman F: A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med* 2005, **11**:1287-1289.
16. Hare S, Di Nunzio F, Labeja A, Wang J, Engelman A, Cherepanov P: Structural basis for functional tetramerization of lentiviral integrase. *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000515.
17. Emiliani S, Mousnier A, Busschots K, Maroun M, Van Maele B, Tempé D, Vandekerckhove L, Moisant F, Ben-Slama L, Witvrouw M, *et al*: Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication. *J Biol Chem* 2005, **280**:25517-25523.
18. Christ F, Voet A, Marchand A, Nicolet S, Desimmié BA, Marchand D, Bardiot D, der Veken V, Nam J, Van Remoortel B, Strelkov SV, *et al*: Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication. *Nat Chem Biol* 2010, **6**:442-448.
19. Yoakim C, Deroyp P, Duplessis M, Gagnon A, Goulet S, Huecke O, Lemke C, Surprenant S: *Preparation of pyrazolylbenzimidazole derivatives for use as HIV replication inhibitors*. Boehringer Ingelheim International GmbH, Germany 2008. WO2008/067644 A1.
20. Tsantrizos YS, Bailey MD, Bilodeau F, Carson RJ, Coulombe R, Fader L, Halmos T, Kawai S, Landry S, Laplante S, *et al*: *Preparation of 2-(tert-butylloxy)-2-(2-methylquinolin-3-yl)acetic acid derivatives as inhibitors of human immunodeficiency virus replication*. Boehringer Ingelheim International GmbH, Germany; 2009. WO2009/062285 A1.
21. Yoakim C, Bailey MD, Bilodeau F, Carson RJ, Fader L, Kawai S, Laplante S, Simoneau B, Surprenant S, Thibeault C, Tsantrizos YS: *Preparation of 2-alkoxy-2-(pyridin-3-yl)acetic acid derivatives as inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV) replication*. Boehringer Ingelheim International GmbH, Germany 2010. WO2010/130034 A1.
22. Fenwick C, Bethell R, Bonneau P, Duan J, Faucher A, Mason S, Poupart M, Simoneau B, Tsantrizos Y, Yoakim C: *Identification of BI-C, a Novel HIV-1 non-Catalytic Site Integrase Inhibitor*. Boston: 18th CROI; 2011.
23. Mitchell ML, Roethle PA, Xu L, Yang H, McFadden R, Babaoglu K: *Benzothiazole Compounds and Their Pharmaceutical use*. US: Gilead Sciences Inc; 2012. WO2012/145728 A1.
24. Bardiot D, Chaltin P, Christ F, Debyser Z, De MM, Marchand A, Marchand D, Voet A: *Preparation of Thieno[2,3-b]Pyridine Derivatives as Viral Replication Inhibitors*. Katholieke Universiteit Leuven, Belg; 2010. WO2010/130842 A1.
25. Chaltin P, Debyser Z, De MM, Marchand A, Marchand D, Smets W, Voet A, Christ F: *Pyrimidine Derivatives as Novel Viral Replication Inhibitors and Their Preparation and use in the Treatment of HIV Infection*. Katholieke Universiteit Leuven, Belg; 2011. WO2011/015641 A1.
26. Carlens G, Chaltin P, Christ F, Debyser Z, Marchand A, Marchand D, Voet A, De MM: *Novel Antiviral Compounds*. Katholieke Universiteit Leuven, Belg; 2011. WO2011/076765 A1.
27. Babaoglu K, Bjornson K, Guo H, Halcomb RL, Link JO, McFadden R, Mitchell ML, Roethle P, Trenkle JD, Vivian RW, Xu L: *2-(Naphth-2-yl)Acetic Acid Derivatives as HIV Antiviral Agents and Their Preparation and use for the Treatment of AIDS*. USA: Gilead Sciences, Inc; 2012. WO2012/003497 A1.
28. Babaoglu K, Bjornson K, Guo H, Halcomb RL, Link JO, Liu H, Mitchell ML, Sun J, Vivian RW, Xu L: *2-(Quinolin-6-yl)Acetic Acid Derivatives as HIV Antiviral Agents and Their Preparation and use for the Treatment of AIDS*. USA: Gilead Sciences, Inc; 2012. WO2012/003498 A1.

29. Bell AS, Gardner IB, Gibson KR, Pryde DC, Wakenhut FM: *Inhibitors of HIV Replication*. Pfizer Ltd., GB; 2012. WO2012/066442 A1.
30. Gerritz S, Langley DR, Li G, Meanwell NA, Pendri A, Trainor GL: *Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Replication*. US: Bristol Myers Squibb Co; 2012. WO2012/033735 A1.
31. De La Rosa MA, Haidar SN, Johns BA, Velthuisen EJ: *Isoquinoline Compounds and Methods for Treating HIV*. US: Glaxo Smithkline LLC; 2012. WO2012/102985 A1.
32. Chasset S, Chevreuril F, Ledoussal B, Le Strat F, Benarous R: *Inhibitors of Viral Replication, Their Process of Preparation and Their Therapeutical Uses*. Laboratoire Biodim, FR; 2012. WO2012/137181 A1.
33. Chasset S, Chevreuril F, Ledoussal B, Le Strat F, Benarous R: *Inhibitors of viral replication, their process of preparation and their therapeutical uses*. Laboratoire Biodim FR 2012. WO2012/140243 A1.
34. Hattori K, Kurihara N, Iwaki T, Inoue T, Akiyama T, Hasegawa Y: *HIV Replication Inhibitor*. Shionogi & Co., JP; 2013. WO2013/002357 A1.
35. Christ F, Shaw S, Demeulemeester J, Desimmi BA, Marchand A, Butler S, Smets W, Chaltin P, Westby M, Debyser Z, Pickford C: Small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75 binding site of integrase block HIV replication and modulate integrase multimerization. *Antimicrob Agents Chemother* 2012, **56**:4365-4374.
36. Tsiang M, Jones GS, Niedziela-Majka A, Kan E, Lansdon EB, Huang W, Hung M, Samuel D, Novikov N, Xu Y, *et al*: New class of HIV-1 integrase (IN) inhibitors with a dual mode of action. *J Biol Chem* 2012, **287**:21189-21203.
37. Kessl JJ, Jena N, Koh Y, Taskent-Sezgin H, Slaughter A, Feng L, de Silva S, Wu L, Le Grice SF, Engelman A, *et al*: Multimode, cooperative mechanism of action of allosteric HIV-1 integrase inhibitors. *J Biol Chem* 2012, **287**:16801-16811.
38. Demeulemeester J, Tintori C, Botta M, Debyser Z, Christ F: Development of an AlphaScreen-based HIV-1 integrase dimerization assay for discovery of novel allosteric inhibitors. *J Biomol Screen* 2012, **17**:618-628.
39. Christ F, Debyser Z: The LEDGF/p75 integrase interaction, a novel target for anti-HIV therapy. *Virology* 2013, **435**:102-109.
40. Wang H, Jurado KA, Wu X, Shun MC, Li X, Ferris AL, Smith SJ, Patel PA, Fuchs JR, Cherepanov P, *et al*: HRP2 determines the efficiency and specificity of HIV-1 integration in LEDGF/p75 knockout cells but does not contribute to the antiviral activity of a potent LEDGF/p75-binding site integrase inhibitor. *Nucleic Acids Res* 2012, **40**:11518-11530.
41. Feng L, Sharma A, Slaughter A, Jena N, Koh Y, Shkriabai N, Larue RC, Patel PA, Mitsuya H, Kessl JJ, *et al*: The A128T resistance mutation reveals aberrant protein multimerization as the primary mechanism of action of allosteric HIV-1 integrase inhibitors. *J Biol Chem* 2013, **288**:15813-15820.
42. Desimmi BA, Schrijvers R, Demeulemeester J, Borrenberghs D, Weydert C, Thys W, Vets S, Van Remoortel B, Hofkens J, De Rijck J, *et al*: LEDGins inhibit late stage HIV-1 replication by modulating integrase multimerization in the virions. *Retrovirology* 2013, **10**:57.
43. Jurado KA, Wang H, Slaughter A, Feng L, Kessl JJ, Koh Y, Wang W, Ballandras-Colas A, Patel PA, Fuchs JR, *et al*: Allosteric integrase inhibitor potency is determined through the inhibition of HIV-1 particle maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013, **110**:8690-8695.
44. Yant S, Tsai L, O'Sullivan C, Cihlar T, Balakrishnan M: *Non-Catalytic Site Integrase Inhibitors Target the Integrase Domain During Virus Production and Induce a Reverse Transcription Block*, Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Gilead Sciences: Atlanta, GA, USA; 2013.
45. Balakrishnan M, Yant SR, Tsai L, O'Sullivan C, Bam RA, Tsai A, Niedziela-Majka A, Stray KM, Sakowicz R, Cihlar T: Non-catalytic site HIV-1 integrase inhibitors disrupt core maturation and induce a reverse transcription block in target cells. *PLoS One* 2013, **8**:e74163.
46. Hayouka Z, Rosenbluh J, Levin A, Loya S, Lebendiker M, Veprintsev D, Kotler M, Hizi A, Loyter A, Friedler A: Inhibiting HIV-1 integrase by shifting its oligomerization equilibrium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:8316-8321.
47. Stanford university HIV drug resistance database. [<http://hivdb.stanford.edu/index.html>].
48. Fenwick C, Tremblay S, Wardrop E, Bethell R, Coulombe R, Elston R, Faucher A-M, Mason S, Simoneau B, Tsantrizos Y, Yoakim C: *Resistance Studies with HIV-1 non-Catalytic Site Integrase Inhibitors*. Cabo, Mexico: In International Workshop on HIV & Hepatitis Virus Drug Resistance and Curative Strategies; 2011.
49. Berg J, Doe B, Steimer KS, Wabl M: HeLa-LAV, an epithelial cell line stably infected with HIV-1. *J Virol Methods* 1991, **34**:173-180.
50. Guiot E, Carayon K, Delelis O, Simon F, Tauc P, Zubin E, Gottikh M, Mouscadet JF, Brochon JC, Deprez E: Relationship between the oligomeric status of HIV-1 integrase on DNA and enzymatic activity. *J Biol Chem* 2006, **281**:22707-22719.
51. Engelman A: The Pleiotropic Nature of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase Mutations. In *HIV-1 Integrase: Mechanism and Inhibitor Design*, Drug Discovery and Development. Edited by Neamati N, Wang B. Wiley; 2011:67-81.
52. Wang JY, Ling H, Yang W, Craigie R: Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. *EMBO J* 2001, **20**:7333-7343.
53. Berthoux L, Sebastian S, Muesing MA, Luban J: The role of lysine 186 in HIV-1 integrase multimerization. *Virology* 2007, **364**:227-236.
54. Lesbats P, Metfiot M, Calmels C, Baranova S, Nevinsky G, Andreola ML, Parissi V: In vitro initial attachment of HIV-1 integrase to viral ends: control of the DNA specific interaction by the oligomerization state. *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:7043-7058.
55. Pommier Y, Marchand C: Interfacial inhibitors: targeting macromolecular complexes. *Nat Rev Drug Discov* 2012, **11**:25-36.
56. Condra JH, Schleif WA, Bhalay OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, Rhodes A, Robbins HL, Roth E, Shivaprakash M, *et al*: In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* 1995, **374**:569-571.
57. Gonzales MJ, Johnson E, Dupnik KM, Imamichi T, Shafer RW: Colinearity of reverse transcriptase inhibitor resistance mutations detected by population-based sequencing. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003, **34**:398-402.
58. Delelis O, Malet I, Na L, Tchertanov L, Calvez V, Marcelin AG, Subra F, Deprez E, Mouscadet JF: The G140S mutation in HIV integrases from raltegravir-resistant patients rescues catalytic defect due to the resistance Q148H mutation. *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:1193-1201.
59. Brussel A, Sonigo P: Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus. *J Virol* 2003, **77**:10119-10124.
60. Michel F, Crucifix C, Granger F, Eiler S, Mouscadet JF, Korolev S, Agapkina J, Ziganshin R, Gottikh M, Nazabal A, *et al*: Structural basis for HIV-1 DNA integration in the human genome, role of the LEDGF/P75 cofactor. *EMBO J* 2009, **28**:980-991.
61. Bushman FD, Engelman A, Palmer I, Wingfield P, Craigie R: Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:3428-3432.
62. Jenkins TM, Hickman AB, Dyda F, Ghirlano R, Davies DR, Craigie R: Catalytic domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase: identification of a soluble mutant by systematic replacement of hydrophobic residues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:6057-6061.
63. Yu F, Jones GS, Hung M, Wagner AH, MacArthur HL, Liu X, Leavitt S, McDermott MJ, Tsiang M: HIV-1 integrase preassembled on donor DNA is refractory to activity stimulation by LEDGF/p75. *Biochemistry* 2007, **46**:2899-2908.
64. Delelis O, Parissi V, Leh H, Mbemba G, Petit C, Sonigo P, Deprez E, Mouscadet JF: Efficient and specific internal cleavage of a retroviral palindromic DNA sequence by tetrameric HIV-1 integrase. *PLoS One* 2007, **2**:e608.
65. Kabsch W: Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010, **66**:125-132.
66. Potterton E, Briggs P, Turkenburg M, Dodson E: A graphical user interface to the CCP4 program suite. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003, **59**:1131-1137.
67. Vagin A, Teplyakov A: Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010, **66**:22-25.
68. Maignan S, Guilloteau JP, Zhou-Liu Q, Clement-Mella C, Mikol V: Crystal structures of the catalytic domain of HIV-1 integrase free and complexed with its metal cofactor: high level of similarity of the active site with other viral integrases. *J Mol Biol* 1998, **282**:359-368.
69. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K: Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010, **66**:486-501.
70. Murshudov GN, Skubak P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, Winn MD, Long F, Vagin AA: REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011, **67**:355-367.

71. Lamzin VS, Perrakis A, Wilson KS (Eds): *The ARP/WARP suite for automated construction and refinement of protein models. In Int. Tables for Crystallography*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic; 2001.
72. Langer GG, Evrard GX, Carolan CG, Lamzin VS: Fragmentation-tree density representation for crystallographic modelling of bound ligands. *J Mol Biol* 2012, **419**:211-222.
73. DeLano WL: *The PyMOL Molecular Graphics System*. Palo Alto, CA: Delano Scientific LLC; 2002.

doi:10.1186/1742-4690-10-144

Cite this article as: Le Rouzic *et al.*: Dual inhibition of HIV-1 replication by integrase-LEDGF allosteric inhibitors is predominant at the post-integration stage. *Retrovirology* 2013 **10**:144.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



II - Défaut d'Infectivité et maintien de l'immunogénicité de virions VIH-1 produits en présence d'INLAIs

A - La présence d'INLAIs ne modifie pas la dimérisation et le packaging de l'ARN viral dans les virions

L'ensemble de cette étude faisant l'objet d'une publication en cours de revue, porte sur la caractérisation de virions VIH-1 produit en présence d'une molécule tête de série synthétisée par Mutabilis nommé MUT-A (il s'agit de la même molécule décrite précédemment sous le nom de BDM1), tant du point de vue packaging de l'ARN viral et reverse transcriptase que du point de vue immunoréactivité de ces virions.

Ma contribution sur cette partie du projet, a été de produire et de vérifier la maturation protéique des particules virales VIH-1 en présence de MUT-A, ou de DMSO pour les virions contrôle, en suivant le protocole décrit dans la figure 1C. Le western blot présenté dans la figure 1E montre que la présence de MUT-A dans les cellules productrices n'influence ni la maturation, notamment de gag, ni la composition protéique des virions néosynthétisés.

Des expériences réalisées en collaboration avec le laboratoire de Ben Berkhout ont permis de mettre en évidence que la présence du composé MUT-A lors de la production virale n'influence pas la dimérisation et le packaging de l'ARN viral dans les virions néosynthétisés. L'activité de leur enzyme RT (reverse transcriptase) est comparable à ce qui est observé pour les virions non traités, cependant les virions produits en présence de MUT-A présentent un défaut à l'étape de transcription inverse dans les cellules cibles (figures 1-5 du papier).

B - Les virions produits en présence d'INLAIs conservent leur immunogénicité

L'immunité spécifique contre un type de pathogène donné, dite adaptative, fait intervenir plusieurs acteurs dont les lymphocytes B et T. La réponse humorale médiée par les lymphocytes B est considérée comme un élément clé dans le développement de thérapies antivirales. Associée à une réponse à médiation cellulaire induite par les lymphocytes T, ces mécanismes permettent d'obtenir une immunité stable et spécifique à l'infection.

La suite de cette étude porte sur l'immunoréactivité de ces virions inactivés afin de déterminer si à plus long terme on pourrait envisager l'utilisation de ces virions inactivés comme immunogène pour la production d'anticorps neutralisants à large spectre.

1. Immunoréactivité de type B

Succinctement, l'immunité humorale *in vivo* consiste en l'activation de lymphocytes B induisant la production d'anticorps reconnaissant spécifiquement un antigène donné de l'agent pathogène causant l'infection. Ces anticorps sont dits neutralisants lorsqu'ils possèdent une activité fonctionnelle d'inhibition de l'infection. Cette réponse immunitaire intervenant sur les étapes précoces de la réplication, les épitopes reconnus par ce type d'anticorps sont donc majoritairement présents sur l'enveloppe virale [435].

Afin de vérifier l'intégrité de l'enveloppe virale des virions VIH-1 produits en présence de MUT-A, des expérimentations basées sur un panel d'anticorps neutralisants, polyclonaux ou monoclonaux, reconnaissant spécifiquement différents épitopes de l'enveloppe du VIH-1 ont été menées dans le laboratoire de Christiane Moog (figure 6 du papier). Les résultats obtenus illustrent le fait que les virions VIH-1 produits en présence de MUT-A ont une immunoréactivité humorale similaire à ce qui est obtenu avec des virions non traités. Cela démontre que la production en présence d'INLAIs n'influence pas la structure glycoprotéique de l'enveloppe des virions ainsi synthétisés.

2. Immunoréactivité de type T

L'immunité à médiation cellulaire fait intervenir plusieurs types cellulaires. Suite à l'infection, les cellules dendritiques (DC) sont capables de phagocyter et de présenter différents antigènes viraux induisant l'activation et la prolifération de lymphocytes T CD4+ et CD8+.

Après avoir vérifié que les virions produits en présence de MUT-A conservent leur immunoréactivité à la réponse humorale, leur capacité immunogénique de la réponse T a également été étudiée. Pour essayer de répondre à cette problématique, j'ai réalisé des expériences de co-cultures de cellules dendritiques et de lymphocytes autologues dans l'équipe de Jose M Gatell (Hospital Clinic, Barcelona) sous la direction de Montse Plana. Ce laboratoire étudie les défenses naturelles et acquises mises en place par des patients infectés par le VIH-1, ainsi que le développement d'immunothérapies.

Toutes les expérimentations sont réalisées à partir de PBMCs isolées de patients séropositifs sous traitement, asymptomatiques, infectés de manière chronique, avec un nombre de lymphocytes T CD4+ > 500 cellules/mm³ et avec 50-10 000 copies ARN VIH 1/ml de sang. Les cellules dendritiques (DC) ainsi isolées, sont incubées avec les virions produits en présence de MUT-A. Les lymphocytes autologues, préalablement marqués avec du CFSE, sont mis en contact avec les DC matures afin d'observer la prolifération des lymphocytes T (LT) CD4+ et CD8+. En effet, Si les DC digèrent et de présentent efficacement les épitopes viraux aux LT, ils seront alors activés et leur prolifération sera corrélée à la diminution de la fluorescence du marqueur intracellulaire CFSE analysée par cytométrie en flux (figures 7-8 du papier). Ces résultats montrent que les virions VIH-1 produits en présence de Mut-A, lorsqu'ils sont utilisés comme stimuli pour les DCs matures autologues, induisent une prolifération de LT CD4+ et CD8+ similaire à ce qui est observé avec des virions non traités.

Afin de déterminer le type de réponse T induite par les virions produits en présence de MUT-A, le dosage simultané d'une vingtaine de cytokines et chimiokines est réalisé par un test ELISA dans le surnageant de co-cultures (figure 9 du papier). L'activation de LT par l'utilisation de virions VIH-1 produits en présence de Mut-A induit une sécrétion de cytokines pro inflammatoires (IL1- β ; IL-6), de cytokines associées à une réponse immunitaire de type Th1 (IL-2R ; IP-10 et IFN- γ) ainsi que de chimiokines corrélées spécifiquement à une réponse anti-virale (MIP-1a ; MIP-1b).

L'ensemble de ces résultats montre que la présence de MUT-A lors de la production virale ne modifie pas leur capacité à stimuler des DC. En effet les virions MUT-A induisent l'activation et la prolifération de LT CD4+ et CD8+ ainsi que la production de cytokines et chimiokines impliquées dans la réponse immunitaire anti-virale spécifique de type Th1 avec une efficacité similaire à ce qui est observé avec des virions VIH-1 non traités.

1 **The HIV-1 integrase-LEDGF allosteric inhibitor MUT-A impairs virus maturation and**
2 **infectivity but does not influence RNA packaging or virus immunoreactivity**

3

4 Short title: MUT-A INLAI-inactivated HIV-1

5

6 Céline Amadori^{1,2,3,4*}, Yme Ubeles van der Velden^{5*}, Nikki van Bel⁵, Damien Bonnard¹,

7 Erwann Le Rouzic¹, Laia Miralles⁶, Julie Brias¹, Francis Chevreuil¹, Sophie Chasset¹, Benoit

8 Ledoussal¹, Luzia Mayr⁷, François Moreau¹, F. Garcia⁶, Jose Gatell⁶, Alessia Zamborlini⁸,

9 Stéphane Emiliani^{2,3,4}, Christiane Moog⁷, Ben Berkhout^{5#}, Montserrat Plana^{6#} and Richard

10 Benarous^{1#}

11

12 ¹Biodim Mutabilis, Romainville 93230, France,

13 ²INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France

14 ³CNRS, UMR8104, Paris, France

15 ⁴University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

16 ⁵Laboratory of Experimental Virology, Department of Medical Microbiology, Center for

17 Infection and Immunity Amsterdam (CINIMA), Academic Medical Center, University of

18 Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands,

19 ⁶AIDS Research Group, IDIBAPS, Hospital Clinic, Barcelona, Spain,

20 ⁷INSERM U1109, Strasbourg, France

21 ⁸CNRS UMR7212, INSERM U944, Université Paris Diderot, Conservatoire National des

22 Arts et Métiers, Paris, France.

23 *These authors contributed equally to this work

24

25 # Address correspondence to Richard Benarous: richard.benarous@mutabilis.fr, to

26 Montserrat Plana: MPLANA@clinic.ub.es, to Ben Berkhout: b.berkhout@amc.uva.nl

27

28 **Abstract**

29 **Background:** HIV-1 Integrase (IN) interacts with the cellular co-factor LEDGF/p75 and

30 tethers the HIV preintegration complex to the host genome enabling integration. Recently a

31 new class of IN inhibitors was described, the IN LEDGF allosteric inhibitors (INLAIs).

32 Designed to interfere with the IN-LEDGF interaction during integration, the major impact of

33 these inhibitors was surprisingly found on virus maturation, causing a reverse transcription

34 defect in target cells.

35 **Results:** HIV-1 virions produced in the presence of a new type of INLAI, MUT-A, were non

36 infectious. However, their protein content, gag protein maturation and genomic viral RNA

37 packaging were comparable to non-treated viruses. Viral RNA genomes were in the dimeric

38 state, the tRNA^{lys3} primer for reverse transcription was properly placed and could be

39 extended *ex vivo*. Reverse transcriptase (RT) extracted from these non-infectious virions
40 was fully active, but reverse transcription was defective in target cells upon virus infection. In
41 studying the immunoreactivity of these non-infectious virions, we found that inactivated HIV-
42 1 particles were captured by anti-HIV-specific neutralizing and non-neutralizing antibodies
43 (b12, 2G12, PGT121, 4D4, 10-1074, 10E8, VRC01) with efficiencies comparable to non-
44 treated virus. Autologous CD4⁺ T lymphocytes proliferation and cytokine induction, induced
45 by MDDC pulsed either with MUT-A-inactivated HIV or non-treated HIV were also found
46 comparable.

47 **Conclusions:** Although strongly defective in infectivity, HIV-1 virions produced in the
48 presence of the MUT-A INLAI have a normal protein and genomic RNA content as well as B
49 and T cell immunoreactivities comparable to non-treated HIV-1. These inactivated viruses
50 form an attractive new type of immunogen to elicit an immune response against HIV-1.

51

52 **Keywords**

53 HIV-1, Integrase, LEDGF, Allosteric integrase inhibitor, LEDGIN, INLAI

54

55 **Background**

56

57 The integration of a DNA copy of the HIV RNA genome into host chromatin is a crucial step
58 of HIV replication [1]. The HIV-1 pre-integration complex is tethered to the host chromosome
59 via the cellular co-factor lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75) [2]. LEDGF/p75
60 is a chromatin-bound protein that interacts with IN via its C-terminal IN binding domain (IBD)
61 [3, 4]. A new class of IN-inhibitors was designed that prevents this IN-LEDGF/p75
62 interaction, named first LEDGINS [5], then ALLINIs [6] for Allosteric IN inhibitors, NCINIs [7-
63 9] for Non Catalytic IN inhibitors, MINIs for Multimerization Integrase Inhibitors [6] or INLAIs
64 for Integrase-LEDGF Allosteric Inhibitors [10]. Since there is not yet a consensus name or
65 acronym for this new class of IN inhibitors we chose in this report the acronym INLAI as a
66 generic name for these inhibitors, which has the advantage to recall the dual mechanism of
67 action of these inhibitors: inhibition of the IN-LEDGF/p75 interaction and induction of an
68 allosteric conformational change and multimerization of IN.

69 INLAIs are allosteric IN inhibitors that bind to the LEDGF binding pocket of IN and are fully
70 active on HIV-1 resistant to INSTIs [5-12]. From a chemical point of view, all INLAIs
71 described up to date share a common motif composed of a tert butyl and a carboxylic acid
72 group that can be linked to different scaffolds, quinoline, naphthyl, phenyl or pyrimidine [5-12].

73 INLAIs have a dual antiretroviral (ARV) activity at two different steps of the HIV-1 replication
74 cycle: Inhibition of the LEDGF/p75-IN interaction accounts for an “early” block of HIV-1
75 replication at integration, but the major impact of INLAIs is during virus maturation or the

76 “late” phase, leading to the production of normal amounts of non-infectious virus. This late
77 effect on virus maturation is linked to INLAI-promoted IN multimerization [8, 10-13].
78 HIV-1 virions produced in the presence of INLAIs are non-infectious and contain aberrant
79 cores as shown by electron microscopy [8, 12, 13]. However, using HIV-1 produced in the
80 presence of the quinoline INLAI compound BID (developed by Boehringer Ingelheim) we
81 recently described that a wild-type level of HIV-1 genomic RNA is packaged in these virions
82 in a dimeric state, and the tRNA^{lys3} primer for reverse transcription was properly placed on
83 the genomic RNA and could be extended *ex vivo*. In addition, RT enzyme extracted from
84 these virions was fully active although these virions were unable to complete reverse
85 transcription in target cells [8]. Fontana et al. found that INLAIs block ribonucleoprotein
86 complex packaging inside viral cores leading to the formation of “eccentric condensates”
87 with high Nucleocapsid (NC) content outside the core [14]. These INLAI-inactivated virions
88 were able to infect target cells, but the subsequent reverse transcription step in target cells
89 was blocked [8, 13].
90 Several attempts have been made to produce inactivated SIV vaccines by treatment with
91 denaturing and inactivating agents such as zinc chelators (2,2'-dithiobisbenzamide (DIBA)),
92 heat, UV or cross-linking agents such as psoralen in non-human primate studies. But none
93 of these attempts has shown significant efficacy in preventing SIV infection or in controlling
94 virus replication and delaying progression of disease (for review [15]). HIV-1 inactivated by

95 similar denaturing methods have also been used in dendritic cell-based therapeutic
96 vaccination, not yet yielding convincing results [16, 17]. INLAI-inactivated HIV-1 particles
97 have remarkably conserved many properties of “native” non-treated HIV-1 particles, but are
98 based on a new ARV drug class under preclinical development and not on a denaturing
99 chemical. In front of the persisting bottlenecks in identifying viable HIV vaccine candidates,
100 we explored the main B and T-cell immunoreactivities of INLAI-inactivated virus particles to
101 study whether they could be considered as a new type of immunogen able to elicit some
102 immune response of interest against HIV-1.

103 Here we describe a new type of INLAI compound, MUT-A. MUT-A shares with all previously
104 described INLAIs a tert butyl motif linked to a carboxylic acid group, but it is composed of an
105 original scaffold, a 5 carbon thiophene (Fig. 1). We studied the ARV activity of MUT-A, its
106 influence on viral RNA packaging and the B-cell and T-cell immunoreactivities of MUT-A-
107 inactivated HIV-1.

108

109 **Methods**

110 **Cell culture:** SupT1 or MT4 T cells were cultured in advanced RPMI 1640 medium (Gibco)
111 supplemented with 1% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco), 2 mM L-
112 glutamine (Gibco), 15 µg/ml streptomycin and 15 units/ml penicillin at 37°C and 5% CO₂.
113 Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were grown in DMEM (Gibco) supplemented

114 with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (Gibco) and 1x minimum essential medium non-
115 essential amino acids (MEM NEAA, Gibco) at 37°C and 5% CO₂.

116 **Compound:** Optimization of our series led to the compound MUT-A, one of the most active
117 molecule. MUT-A was prepared as described in a patent application [18], according to the
118 example 11. MUT-A was dissolved in DMSO to generate a 10 mM stock solution and was
119 added to the culture medium at a final concentration as indicated. The equivalent volume of
120 DMSO was added to control cultures.

121 **Virus production and replication:** 293T cells were seeded in T75 culture flasks, cultured to
122 50-70% confluency and transfected with 20 µg pLAI or pNL4-3 DNA plasmid that encodes
123 the wt HIV-1 LAI or HIV-1 NL4-3 isolates respectively using Lipofectamine2000 (Invitrogen).
124 MUT-A was added at 6 h after transfection. The culture supernatant was harvested at 48 h
125 after transfection and used as virus stock or for viral RNA isolation. The CA-p24 level was
126 measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described previously. SupT1
127 T cells (5x10⁶ cells in 5 ml) were infected with the HIV-1 LAI virus stocks (equivalent of 1 ng
128 CA-p24). Similarly MT4 cells (5x10⁶ cells in 5 ml) were infected with the HIV-1 NL4-3 virus
129 stocks (equivalent of 1 ng CA-p24). When indicated, the culture was split and MUT-A or
130 DMSO was added. Viral spread was monitored by measuring the CA-p24 level in the virus
131 culture medium every 2 days.

132

133 **Viral RNA isolation**, Northern blot analysis, primer extension assays, the RT activity assay:
134 were performed as described in details in [19]. Briefly, HIV-1 LAI virus produced by 293T
135 cells with or without MUT-A was pelleted by ultracentrifugation over a 20% sucrose cushion
136 in phosphate buffered saline (PBS) at 32,000 rpm (175,000 x g). Virions were lysed at 37°C
137 by addition of proteinase K and viral RNA was extracted twice with phenol-chloroform-
138 isoamylalcohol (25:24:1) at 4°C, ethanol-precipitated and washed with 70% ethanol. RNA for
139 primer extension was resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA) and
140 stored at -80°C. RNA for northern blotting was resuspended in TN buffer (10 mM Tris-HCl
141 pH7.5, 100 mM NaCl) and treated with DNase (Ambion) for 60 min at 37°C. The RNA pellet
142 was resuspended in TENS buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1%
143 SDS), aliquoted and stored at -80°C.

144 **Northern blot analysis:** Non-denaturing and denaturing northern blot analyses were
145 performed on viral RNA isolated from equal amounts of HIV-1 LAI virions (equivalent of 250
146 ng CA-p24). For non-denaturing northern blot, RNA was mixed with non-denaturing sample
147 buffer (30% glycerol, 0.25% bromophenol blue dye) and analyzed by electrophoresis on a
148 0.9% agarose gel in 1x TBE buffer. The gel for non-denaturing northern blotting was soaked
149 in 10% formaldehyde at 65°C before blotting. For both northern blots, an UV crosslinker
150 (Stratagene) was used to cross-link the RNA to the membrane. The probe, consisting of a
151 1014-bp DNA fragment covering the Nef, U3 and R regions of the pLAI plasmid (positions

152 8770-9784, relative to the transcriptional start site at +1), was labeled with ^{32}P by random-
153 primed labeling (High Prime DNA labeling kit; Roche Diagnostics) using $\alpha^{32}\text{P}$ -CTP (0.33
154 MBq/ μl , Perkin-Elmer). Quantification was performed using a phosphorimager (Amersham
155 Biosciences) and the ImageQuant software package. To determine the thermal stability of
156 the HIV-1 RNA dimer, viral RNA was incubated at increasing temperatures (40 - 60°C) for 10
157 min before the RNA was analyzed on a non-denaturing northern blot. The T_m was
158 calculated as the temperature at which 50% of the RNA dimer was melted into faster
159 migrating RNA forms.

160 **tRNA and CN1 primer extension assay:** Viral RNA (equivalent of 50 ng CA-p24) in buffer
161 (83 mM Tris-HCl pH7.5, 125 mM KCl) was either used directly for tRNA^{lys3} extension or was
162 mixed with primer CN1 (GGTCT GAGGGATCTCTAGTTACCAGAGTC, complementary to
163 nucleotides 123-151 of LAI RNA), heated at 85°C for 2 min, at 65°C for 10 min, followed by
164 slow-cooling to room temperature to allow primer annealing. The RT p51/p66 heterodimer
165 [kindly provided by D. Stammers, Glaxo Wellcome Research Laboratories, MRC AIDS
166 reagent project] was added to the tRNA^{lys3} and CN1 extension samples. The mixture was
167 incubated at 37°C for 30 min to extend the naturally associated tRNA^{lys3} primer or the
168 annealed CN1 DNA primer. The cDNA was analyzed on a denaturing 6% polyacrylamide-
169 urea sequencing gel and bands were quantified using a phosphorimager (Amersham
170 Biosciences) and ImageQuant software.

171 **Reverse transcriptase (RT) activity assay:** As described in [19], we used a real-time
172 qPCR-based RT assay [20, 21] to measure the RT activity extracted from HIV-1 LAI virus
173 produced in the presence or absence of MUT-A. We used 120 ng MS2 RNA [Roche], 3'
174 primer A [GCCTTAGCAGTGCCCTGTCT] AMV-RT (New England Biolabs), 5' primer B
175 [AACATGCTCGAGGGCCTTA], and the MS2-probe [5'FAM-
176 CCCGTGGGATGCTCCTACATGTCA-3'TAMRA].

177 **B-cell Immunoreactivity:** B-cell immunoreactivity of HIV-1 NL4-3 virus produced in the
178 absence or presence of MUT-A was studied by virus immuno capture assays as described
179 [22], using the panel of anti-HIV-1 neutralizing and non-neutralizing antibodies [23-31] listed
180 in Figure 6 B. This assay measures the concentration of whole native virus particles
181 captured by Abs coated onto 96-well plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) as
182 previously described [22, 32, 33]. Briefly, HIV particles were incubated in Ab-coated ELISA
183 plates for 1 h. Unbound virus was removed by washing with PBS containing 10% fetal calf
184 serum. Virus captured by Abs was lysed with 10% NP-40 and quantified by dosage of CA-
185 p24 by ELISA (Innogenetics/Ingen, Ghent, Belgium).

186 **Patients and samples:** Samples of EDTA-anticoagulated venous blood samples were
187 obtained from chronic asymptomatic HIV-1-infected patients with baseline CD4+T-cell
188 counts >450 cells/mm³, and plasma viral load (pVL) <50 HIV-1 RNA copies/ml, who were on
189 antiretroviral therapy (ART). All the subjects participating in the study were recruited at the

190 Service of Infectious Diseases & AIDS Unit of the Hospital Clinic from Barcelona (Spain). All
191 the individuals gave informed written consent and this study was reviewed and approved by
192 the Institutional Ethical Committee board of Hospital Clinic (Barcelona, Spain).

193 **Generation of monocyte-derived dendritic cell (MDDC):** Generation of monocyte derived
194 dendritic cells (MDDC) was performed as previously described [34]. Essentially, peripheral
195 blood mononuclear cells (PBMC) were isolated immediately after venous extraction by using
196 a standard Ficoll gradient. Cells were processed immediately after isolation. To obtain
197 human monocytes, PBMC were incubated in plastic plates (2 h at 37°C) in a humidified
198 atmosphere with 5% CO₂ in MDDC medium (serum-free XVIVO-15 medium, Lonza,
199 Maryland, USA) supplemented with 1% autologous serum, gentamicin (Braun Medical,
200 Melsungen, Germany) and fungizone (amphotericin B, Bristol-Myers Squibb, Rueil-
201 Malmaison, France) and 1 µM zidovudine (Retrovir from GlaxoSmithKline, Madrid, Spain) to
202 avoid HIV replication. To obtain immature MDDC, adherent cells were washed four times
203 with pre-warmed MDDC medium and then cultured for 5 days in the presence of 1000 U/ml
204 each of recombinant human IL-4 (Strathmann Biotec AG, Hamburg, Germany) and
205 recombinant human GM-CSF (Peprotech, London, UK) on days 0 and 2. Immature MDDC in
206 fresh MDDC medium, IL-4 and GM-CSF (1000 U/ml each) were exposed to NL4.3 virus
207 either treated with DMSO, inactivated with MUT-A at 1 µM (1 or 5 µg/ml of HIV gag CA-p24),
208 inactivated with AT-2 1 µg/ml, and controls (SEA (Staphilococcus Enterotoxin A) 100 pg/ml).

209 To obtain mature MDDC, a cocktail of recombinant human cytokines containing TNF- α , IL-6
210 (1000 IU/ml each, Strathmann Biotec AG), IL-1 β (300 UI/ml, Strathmann Biotec AG) and
211 PGE2 (1 mg/ml, Pfizer, Madrid, Spain) was added at 2 h post-exposure, and the mixture was
212 incubated for 48 h.

213 **Autologous co-cultures:** As a source of enriched T cells we employed autologous fresh
214 PBMC depleted of monocytes after adherence to plastic as indicated above for the
215 generation of MDDC. These monocyte-depleted lymphocytes were washed and
216 resuspended in serum-free XVIVO-10 medium and labelled with CFSE following the
217 instructions of the manufacturer (CellTrace CFSE cell proliferation kit, Molecular Probes,
218 Paisley, UK). Autologous virus-exposed and matured MDDC were washed and resuspended
219 in XVIVO-10 and co-cultured with autologous fresh CFSE-labeled lymphocytes in a final
220 volume of 0.2 ml in XVIVO-10 medium supplemented with 1 μ M zidovudine to impede
221 possible replication of endogenous HIV-1. The contribution of MDDC alone and monocyte
222 depleted PBMC (lymphocytes) alone was determined as negative controls of proliferation
223 and cytokine secretion. The co-cultures were done in triplicates at 37°C in a humidified
224 atmosphere of air with 5% CO₂.

225 **Assessment of T cell proliferation and flow cytometry:** After 6–7 days, proliferating
226 CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells were determined by direct staining with mAbs conjugated
227 with a-CD3-Per-CP and a-CD8-PE. Mouse Ig isotypes mAbs (from BD Biosciences)

228 conjugated with PerCP or PE were used as negative control mAbs. The stained cells were
229 analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). T cell populations were
230 selected by forward and side light-scatter parameters and sub-gated for CD4 or CD8
231 expression. Cells that proliferated after the co-culture had lower intensity of CFSE (CFSE^{low})
232 in comparison with basal conditions. T cell specific proliferation was expressed as the
233 percentage of CFSE^{low} cells after co-culture with MDDC exposed to different virus minus the
234 percentage of (mock-treated) CFSE^{low} cells.

235 **Cytokine and chemokine secretion by autologous MDDC-T cells co-cultures:** The
236 secretion of cytokines and chemokines induced during autologous MDDC-T cells co-cultures
237 was measured in the culture supernatant using the Luminex technology (Cytokine Human
238 25-Plex Panel, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions.
239 The following 25 mediators were tested: Eotaxin, GM-CSF, IL- 1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R, IL-4,
240 IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL- 12p40/p70, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- α , IFN- γ , IP-10, MCP-1,
241 MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES and TNF- α .

242

243 **Results**

244 **Antiretroviral activity of MUT-A**

245 As shown in Figure 1-A, MUT-A is an original INLAI compound of 394 g/mol molecular
246 weight, with a 5-membered heterocyclic thiophene core substituted by a pyridine group, a

247 cyclohexen moiety and the sterically bulky tertbutoxy-ether key side chain. MUT-A has
248 potent anti-HIV activity with an EC₅₀ of 32 ± 9 nM or 12 ± 6 nM in MT4 cells infected by
249 NL4-3 or HXB2 HIV-1 strains, respectively. Cellular toxicity of MUT-A was low with CC₅₀ of
250 42 ± 9 μ M in MT4 cells, yielding a selectivity index of 1355. We infected SupT1 T cells with
251 the HIV-1 LAI strain and cultured the cells with or without MUT-A (160 nM, 5x EC₅₀). Viral
252 spread was monitored by measuring the CA-p24 level in the culture supernatant. Whereas
253 efficient virus replication resulting in a rapid increase in CA-p24 level was scored in the
254 control culture, HIV-1 LAI was efficiently blocked by MUT-A (Fig. 1B).

255 To test the effect of MUT-A on virus production, we transfected HEK 293T cells with the HIV-
256 1 encoding plasmid pLAI [35] and cultured the cells in the presence or absence of MUT-A
257 (Fig. 1C). The virus-containing supernatant was harvested 48 hours later and the CA-p24
258 level was determined by ELISA. Virus production on HEK 293T cells was not affected by
259 MUT-A (Fig. 1D). Western blot analysis of virions showed similar protein content to
260 untreated virions, while virions treated with saquinavir (SQN) were clearly defective for
261 protein maturation (Fig. 1E). Next, we tested whether virus produced in the presence of
262 MUT-A can promote a spreading infection in SupT1 T cells. No additional MUT-A was added
263 during SupT1 culturing. Although we did not wash away MUT-A that is present in the virus
264 stock, the high dilution factor (~2500x) and frequent passaging of the cell cultures (every 3-4
265 days), makes a sustained antiviral effect unlikely. Efficient viral spreading was observed

266 upon infection of the cells with virus produced in the absence of MUT-A. In contrast, the
267 presence of MUT-A during virus production severely impaired virus infectivity such that no
268 spreading infection could be established (Fig. 1F). Similar effects have been reported for
269 other INLAIs [6, 7, 10-12, 19].

270 **MUT-A does not affect HIV-1 RNA packaging**

271 One documented effect of INLAIs at the late phase of HIV-1 virion assembly and maturation
272 is mislocalization of the ribonucleoprotein outside of the capsid core [8,10,12,13]. We tested
273 whether the HIV-1 RNA genome is packaged in these misformed virion particles. Virus was
274 produced on HEK 293T cells with or without MUT-A. The virions were pelleted from the
275 culture supernatant by ultracentrifugation and the viral RNA was subsequently extracted.
276 The amount of full-length HIV-1 RNA was determined by denaturing northern blot analysis of
277 equal amounts of virus particles (based on the CA-p24 level). A similar level of the full-length
278 9-kb viral RNA was observed in the presence and absence of MUT-A, which shows that
279 MUT-A does not affect the packaging level of full-length genomic RNA (Fig. 2A and 2B for
280 band quantitation).

281 **HIV-1 RNA dimerization is not affected by MUT-A treatment**

282 As for all retroviruses, the HIV-1 genome is packaged as a non-covalently linked RNA dimer.
283 It is thought that labile RNA dimers are packaged, and subsequently stabilized during virus
284 maturation (reviewed in [36]). MUT-A could have an impact on HIV-1 RNA dimerization

285 during virus assembly maturation. We therefore investigated the dimeric state of the RNA
286 genomes isolated from virus particles produced in the absence or presence of MUT-A by
287 using non-denaturing northern blot (Fig. 2C and bands were quantitated in Fig. 2D). Most of
288 the genomic RNA extracted from MUT-A-untreated virions was in the dimeric state (~82%).
289 A similar level was observed for the MUT-A-treated virions.

290 We next probed the thermostability of the RNA dimers as a criteria of dimer maturation. The
291 viral RNA was incubated at increasing temperatures for 10 min before analysis on a non-
292 denaturing gel followed by northern blotting (Fig. 3A). The melting curves of HIV-1 dimeric
293 RNA produced with or without MUT-A are shown in Figure 3B. The melting temperature at
294 which 50% of the dimer is converted into monomer, was very similar for the virus produced
295 in the presence or absence of MUT-A ($T_m = 51.9^\circ\text{C}$ and 52.1°C , respectively). These results
296 suggest that RNA dimer formation and maturation are normal in HIV-1 produced in the
297 presence of MUT-A, despite the fact that the RNA genome is mislocalized outside the virus
298 core.

299 **Reverse Transcriptase activity is comparable to non-treated HIV-1 in virus produced** 300 **in the presence of MUT-A**

301 Jurado *et al.* and others [13] showed that the process of reverse transcription of virus
302 produced in the presence of INLA1 (BID) is blocked in target cells. One of the reasons could
303 be improper Gag-Pol processing or the generation of an inactive RT enzyme due to the

304 apparent virus maturation defect. We therefore extracted the RT enzyme from virus particles
305 and tested for its activity. The RT enzyme was extracted from virions by addition of Triton-
306 X100 and used to reverse transcribe an MS2 RNA template with an annealed DNA primer
307 upon addition of dNTPs. The cDNA product was quantified by real-time PCR (qPCR) using a
308 MS2-specific probe. After correction for the virus input based on CA-p24, we measured a
309 similar RT activity in the extracts of viruses generated with or without MUT-A (Fig. 4). This
310 result indicates that MUT-A does not affect RT production and activity.

311 **MUT-A does not affect initiation of reverse transcription in vitro by tRNA^{lys3} primer**

312 The MUT-A impact on reverse transcription could also be caused by improper placement of
313 the host tRNA^{lys3} primer on the viral RNA, which is an essential step for reverse transcription
314 initiation. To visualize the tRNA^{lys3} primer bound to the viral RNA, tRNA^{lys3} can be extended *in*
315 *vitro* by incubating the virion-extracted RNA with dNTPs and exogenous RT enzyme (Fig.
316 5B) [37]. Viral RNA-tRNA^{lys3} complexes were isolated from virus particles produced in the
317 presence or absence of MUT-A. The mature HIV-1 RT p61/p55 enzyme and dNTPs were
318 added to the RNA isolated from an equal amount of virions (as determined by the input CA-
319 p24 level). The resulting 257-nt tRNA^{lys3}-cDNA product was visualized on a denaturing
320 polyacrylamide gel and quantitated with a phosphor imager. A similar level of this product
321 was observed with the RNA isolated from untreated or MUT-A treated virions. This result
322 shows that the tRNA primer is present and that it can be extended efficiently, irrespective of

323 the presence of MUT-A during virus production (Fig. 5A and 5C). Extension of the heat-
324 annealed control DNA primer CN1 yielded also a similar level of 151-nt cDNA product for the
325 MUT-A treated and untreated virus sample (Fig. 5A and 5D), confirming that HIV-1 RNA was
326 packaged at similar efficiency in the presence or absence of MUT-A. The relative
327 tRNA^{lys3}/CN1 ratio was not affected either, which illustrates that the tRNA^{lys3} occupancy of
328 the viral RNA was not affected by MUT-A (Fig. 5E). These results demonstrate that the
329 formation of a proper initiation complex (HIV-1 RNA with annealed tRNA^{lys3} primer) is not
330 influenced by MUT-A.

331 **Immunoreactivity of MUT-A-inactivated HIV-1 against HIV-1 Env specific antibodies**

332 We analyzed HIV-1 NL4-3 virions produced in the absence or presence of MUT-A for their
333 immunoreactivity against a panel of polyclonal and monoclonal neutralizing and non-
334 neutralizing anti-HIV-1 Env antibodies. Viral particles were captured by the antibodies coated
335 on a 96 well ELISA plate and, after removal of unbound virus, we quantitated captured virus
336 by detection of CA-p24 by ELISA after virus lysis (Fig. 6A). This assay allows the detection
337 of the capture of whole well-preserved virus particles [32]. The neutralizing and non-
338 neutralizing antibodies used in these virus capture assays are listed in Figure 6B together
339 with their binding sites. This panel comprises two polyclonal antibodies: one HIV-1 specific
340 neutralizing antibody (F6 Gri/Ly) and one non-specific IgG antibody as negative control, and
341 seven anti-HIV Env monoclonal antibodies (mAbs) including two neutralizing mAbs directed

342 against the CD4 binding site (b12 and VRC01), two neutralizing mAbs against the MPER
343 gp41 epitope (2G12 and 10E8), a non-neutralizing mAb against gp41 (4D4), two neutralizing
344 mAbs against the V3 envelope epitope (PGT121 and 10/1074), and one irrelevant non-
345 specific mAb (Synagis) as an additional negative control. Three antibody concentrations
346 were used for each capture assay. As shown in Figure 6C, NL4-3 MUT-A-inactivated
347 particles were captured by the HIV Env specific antibodies with comparable efficiency as the
348 non-treated NL4-3 particles. The two non-specific antibodies were as expected negative in
349 these capture assays. Except for the 10E8 and the 10/1074 mAbs which captured a
350 comparable low amount of non-treated or inactivated virus, all other specific antibodies were
351 quite efficient in these virus capture assays. These results indicate that the MUT-A-
352 inactivated NL4-3 virus particles were similarly immunoreactive as wt virus against all these
353 anti-HIV-1 Env specific antibodies, indicating the preservation of the envelope glycoprotein
354 structure following the inactivation of virus particles.

355 **T-cell immunoreactivity of DCs from HIV+ patients loaded with MUT-A-inactivated HIV-**
356 **1 NL4-3 co-cultured with autologous T lymphocytes**

357 We next investigated the T-cell immune responses induced by MDDC pulsed with non-
358 treated and MUT-A-inactivated HIV-1 NL4-3, as well as AT-2-inactivated NL4-3 and the SEA
359 super antigen as positive controls. After 6-days of co-culture, T cell proliferation induced by
360 virus-loaded MDDC or MDCC pulsed with the SEA super antigen was estimated by loss of

361 CFSE labelling (Fig. 7). Proliferation was observed essentially on CD4⁺ T cells, (Fig. 8).

362 Interestingly, the extend of CD4⁺ T lymphocyte proliferation observed with MDDCs loaded

363 with MUT-A-inactivated NL4-3 was comparable or even higher than that obtained with

364 MDDCs loaded with non-treated NL4-3 as shown in flow cytometry dot plots in Figure 8 A

365 (28.9% loss of CFSE labelling for MUT-A inactivated NL4-3 versus 16.8% for wt NL4-3) or

366 from quantitation of three independent experiments (Fig. 8B). This CD4⁺ T cell proliferation

367 observed with MDDCs loaded with MUT-A-inactivated NL4-3 was also comparable to that

368 obtained with AT2-inactivated virus (29% loss in Fig. 8A). We also observed a small loss of

369 CFSE labelling in CD8⁺ T cells. However, it seemed that CD8⁺ T lymphocytes did not react

370 well in this assay, as shown by the weak loss of CFSE labelling obtained also with CD8⁺ T

371 cells using MDDCs loaded with the super antigen SEA (2.7% as shown in Fig. 8A or about

372 5% in average of 3 independent experiments (Fig. 8C)).

373 To further characterize the effects of the MDDC exposure on MUT-A-inactivated-HIV-1 virus

374 on the T-cell induced immune responses, the levels of secreted cytokines and chemokines

375 in the culture supernatants of autologous pulsed MDDC and T cells co-cultures were

376 assessed by Luminex technology. Results shown in Figure 9 (A-D) indicated that MDDC

377 pulsed with MUT-A-inactivated NL4-3 induced secretion of IL-12 pro-inflammatory cytokine,

378 Th1 cytokines (IFN- γ and IL-2R) as well as chemoattractant and antiviral chemokine (MIP-

379 1 β), among others (namely IL-6 and MIP-1 α , not shown). This pattern of

380 cytokine/chemokine secretion reinforces the results obtained with CD4⁺ T cells proliferation
381 assays and illustrates the significant induction of HIV-specific T cell immune response
382 promoted by MUT-A-inactivated HIV-1 loaded on DCs isolated from HIV-1 infected subjects.

383

384 **Discussion**

385 Here, we describe MUT-A as a new type of IN-LEDGF allosteric inhibitor. This compound
386 consists of a 5-carbon thiophene scaffold linked to the common carboxylic acid and tert butyl
387 motives present on all INLAIs reported to date. INLAIs that disrupt the IN-LEDGF/p75
388 interaction do not only affect the 'early' process of HIV-1 integration but, unexpectedly, also
389 the 'late' process of virus maturation, triggering a strong infectivity defect when HIV-1 is
390 produced in the presence of these inhibitors. This infectivity defect does not correlate with
391 any detectable change in the protein content of these defective virions and the maturation
392 state of the structural Gag and Gag-Pol proteins as indicated by western blot analysis of
393 MUT-A inactivated virus (Fig. 1E).

394 Because of the intricate link between virus maturation and several of the viral RNA-mediated
395 processes, we first investigated the effect of the INLAI compound MUT-A on RNA processes
396 during virion assembly. We found that MUT-A, like other INLAIs renders the progeny virus
397 non-infectious when present during virus production. However, likewise the previous report
398 with BID-treated viruses [19], we did not observe any effect on HIV-1 genomic RNA

399 packaging and dimerization, tRNA^{lys3} placement on the viral RNA and activity of the co-
400 packaged RT enzyme. Using two different methods, denaturing northern blot (Fig. 2 A, B)
401 and primer extension analysis (Fig. 5 A, D), we measured efficient HIV-1 RNA packaging in
402 the presence of MUT-A. These results confirm and generalize the finding that the viral RNA
403 genome and the initiation of reverse transcription is not a target of INLAIs.

404 We also could not detect differences in dimer formation of the HIV-1 RNA genome (Fig. 2C,
405 D) and the stability of these dimers (Fig. 3). These results imply that RNA packaging and
406 dimerization are not affected by its aberrant localization outside the virus core in INLAI-
407 treated virions, and suggest that RNA dimer maturation does not require a correct virus core
408 conformation. Cell entry is not affected for virus produced in the presence of INLAIs, but
409 there is a reverse transcription block in these target cells [8, 12,13]. We show that the
410 packaged RT enzyme is fully active on exogenous templates and that the tRNA^{lys3} primer is
411 correctly placed on the genomic RNA for cDNA synthesis. Thus, all basic factors required for
412 reverse transcription are functionally present in INLAI-treated virions, which nevertheless are
413 severely defective in reverse transcription. Several studies indicated that the first step of
414 reverse transcription (initiation and production of strong-stop cDNA) is inhibited [8, 12,13].
415 This may indicate that the components, although present and active in INLAI-treated virions,
416 are not located at the right position at the right time.

417 Since we could not observe any detectable change in the protein content of MUT-A
418 inactivated HIV-1 neither in the packaging of viral RNA nor in exogenous RT activity, we
419 completed this analysis by inspecting further to the immunoreactivity of these MUT-A
420 inactivated HIV-1 particles. We indeed found that these inactivated viruses exhibit conserved
421 B and T cell immunoreactivity, comparable with that of non-treated HIV-1. MUT-A-inactivated
422 viruses were captured by multiple neutralizing and non-neutralizing polyclonal and
423 monoclonal anti-HIV Env antibodies with an efficiency comparable to that of non-treated
424 HIV-1. These results indicate that MUT-A-inactivated HIV-1 particles conserve various
425 important native epitopes for a B-cell immune response such as the CD4 binding site and V3
426 epitope on the gp120 Env surface subunit or the major proximal epitope of the gp41 TM
427 subunit.

428 In addition to the exploration of the immunoreactivity of MUT-A-inactivated HIV-1 with
429 regards to this panel of neutralizing and non-neutralizing anti-Env antibodies, we studied if
430 these inactivated viruses were suitable to elicit a CD4⁺ and CD8⁺ T-cells immune response
431 when loaded ex-vivo on MDDCs isolated from subjects infected by HIV-1. We measured a
432 strong CD4⁺ T helper cell proliferative response, comparable or even higher than that
433 induced by non-treated viruses. This indicates that MUT-A inactivated viruses are well
434 recognized by professional antigen presenting cells. In contrast, the CD8⁺ T cell proliferative
435 response was much weaker, but the meaning of this was not obvious since we also

436 observed a very weak CD8 response against the SAE super antigen that was used as
437 positive control.

438 These results suggest that MUT-A treatment during virus production did not alter the
439 conformation of epitopes at the surface of the virus. In fact, previous work has indicated that,
440 for MDDC, small amounts of antigen are sufficient for presentation on MHC molecules and
441 activation of T cells. Some of these approaches have been used with antigens from non-
442 replicating viruses, including aldrithiol-2 (AT-2)-inactivated HIV-1 [38-40] or defective virus
443 [41]. As we describe in this report, MUT-A-inactivated virus conserves conformational and
444 functionally intact surface envelope proteins that can interact with T cells as well as with
445 surface receptors present on circulating dendritic cells and monocytes. One of the
446 advantages of MUT-A inactivation over other modes of inactivation such as AT2 treatment is
447 that MUT-A is an ARV compound in development and not a denaturing or toxic agent.

448

449 **Conclusions**

450 In conclusion, in this report we described a new type of INLAI, MUT-A which consisting of an
451 original scaffold, a 5-carbon thiophene group linked to carboxylic acid and tert-butyl moieties
452 that are found in all INLAIs. We demonstrated that HIV-1 inactivated by MUT-A displays a
453 strong defect in infectivity. However, this strong infectivity defect did not correlate with
454 detectable change in the viral protein content, Gag maturation, viral RNA packaging and

455 exogenous RT activity. In addition, from the point of view of both the B-cell immunoreactivity
456 against a panel of neutralizing and non-neutralizing anti-HIV-1 Env antibodies, as well as the
457 T CD4⁺ helper cell proliferative response, the MUT-A inactivated HIV-1 behaves like a strong
458 and efficient antigen capable to promote large B and T cells immune responses comparable
459 or even higher to non-treated virus. Up to date the only structural difference that has been
460 observed between INLAI-inactivated HIV-1 and non-treated virus is the formation of an
461 eccentric core and misplacement of the genetic RNA material outside the viral core. The
462 work reported here concerning the B and T-cell immunoreactivities displayed by MUT-A
463 inactivated HIV-1 suggests that the surface of such inactivated virions, which plays an
464 essential role in eliciting B and T cell immune responses, seems to be unchanged. However,
465 all our work has been performed on X4 LAI HIV-1 isolate and on NL4-3, a lab-adapted virus.
466 It remains to be seen whether these observations could be extended to multiple HIV-1
467 primary isolates. If this is the case, it would be worth to check whether the use of such
468 INLAI-inactivated viruses as immunogen suffices to raise a protective neutralizing antibody
469 response against HIV and could be used as therapeutic adjuvant to ART that could be tested
470 in a small animal model of HIV-1 infection. Interestingly, while this manuscript was in
471 preparation, Vranckx and colleagues [42] published a paper showing that LEDGINs can
472 relocate and retarget HIV integration in a HIV reservoir that is refractory to reactivation by
473 different latency-reversing agents, supporting the notion that this INLAI class of compounds

474 could reduce reactivation of residual latent HIV. In a commentary on this work, Mesplede
475 and Wainberg ([43]) raise the question whether LEDGINS could be able to play a role in a
476 cure for HIV infection? The work presented here, together with that of Vranckx et al.,
477 suggests that it is worthwhile to explore this possibility and that INLAIs could be exploited as
478 adjuvant for HIV cure and vaccine studies.

479

480 **Declarations**

481 **Ethics approval**

482 All the subjects participating in the study were recruited at the Service of Infectious Diseases
483 & AIDS Unit of the Hospital Clinic from Barcelona (Spain). All the individuals gave informed
484 written consent and this study was reviewed and approved by the Institutional Ethical
485 Committee board of Hospital Clinic (Barcelona, Spain).

486

487 **Consent for publication**

488 Not applicable

489

490 **Availability of data and material**

MUT-A chemical structure was deposited in PubChem substance under

Structure ID: 313573313

491 **Competing interests**

492 CA, DB, ELR, SC, BL, FM, RB are employees of Biodim Mutabilis, YUVDV, NVB, LM, FG,

493 JG, AZ, SE, CM, BB and MP declare no competing interest.

494

495 **Author's contribution**

496 CA, YUVDV, NVB, performed the experiments and analyzed the data; DB, ELR, LM, made

497 substantial contributions to acquisition, analysis and interpretation of data; SC, BL, FM, FG,

498 JG, AZ, SE, CM, have been involved in the design of the experiments, interpretation of data

499 and revising the manuscript critically; BB, MP and RB designed and coordinated the full

500 study and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

501

502 **Acknowledgments**

503 The authors thank Stéphane Huguet for support, Juliette Nguyen, Roxane Beauvoir and

504 Armelle Walton for assistance in virology, and the NIH AIDS research repository for

505 reagents. Celine Amadori is a recipient of a CIFRE doctoral fellowship from the Association

506 National Recherche Technologie (ANRT). We also thank all the patients who gave their

507 informed consent for this study.

508

509 **Funding:**

510 This work was supported by BIODIM under Authorization Number DUO 2145, assigned by
511 the French Ministry of Research for work with genetically modified organisms, and by grants
512 from EU FP7 under the HIVINNOV consortium, grant agreement 305137 and from Eurostar
513 grant agreement E!10239. Felipe Garcia team was supported by grants SAF2015-66193-R,
514 SAF2012-39075, Montserrat Plana by grant FIS PI15 and Nikki van Bel by NWO-CW (TOP
515 grant)..

516

517 **References:**

518

- 519 1. Lesbats P, Engelman AN, Cherepanov P. Retroviral DNA Integration. *Chem Rev.*
520 2016; 10.1021/acs.chemrev.6b00125.
- 521 2. Engelman A, Cherepanov P. The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and
522 HIV-1 replication. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000046.
- 523 3. Cherepanov P, Maertens G, Proost P, Devreese B, Van Beeumen J, Engelborghs Y,
524 De Clercq E, Debysse Z. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with
525 LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem.* 2003;278:372-81.

- 526 4. Emiliani S, Mousnier A, Busschots K, Maroun M, Van Maele B, Tempe D,
527 Vandekerckhove L, Moisant F, Ben-Slama L, Witvrouw M, et al. Integrase mutants
528 defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and
529 HIV-1 replication. *J Biol Chem.* 2005;280:25517-23.
- 530 5. Christ F, Voet A, Marchand A, Nicolet S, Desimmie BA, Marchand D, Bardiot D, Van
531 der Veken NJ, Van Remoortel B, Strelkov SV, et al. Rational design of small-
532 molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication. *Nat*
533 *Chem Biol.* 2010;6:442-8.
- 534 6. Kessl JJ, Jena N, Koh Y, Taskent-Sezgin H, Slaughter A, Feng L, de Silva S, Wu L,
535 Le Grice SF, Engelman A, et al. Multimode, cooperative mechanism of action of
536 allosteric HIV-1 integrase inhibitors. *J Biol Chem.* 2012;287:16801-11.
- 537 7. Tsiang M, Jones GS, Niedziela-Majka A, Kan E, Lansdon EB, Huang W, Hung M,
538 Samuel D, Novikov N, Xu Y, et al. New class of HIV-1 integrase (IN) inhibitors with a
539 dual mode of action. *J Biol Chem.* 2012;287:21189-203.
- 540 8. Balakrishnan M, Yant SR, Tsai L, O'Sullivan C, Bam RA, Tsai A, Niedziela-Majka A,
541 Stray KM, Sakowicz R, Cihlar T. Non-catalytic site HIV-1 integrase inhibitors disrupt
542 core maturation and induce a reverse transcription block in target cells. *PLoS One.*
543 2013;8:e74163.

- 544 9. Fenwick C, Amad M, Bailey MD, Bethell R, Bos M, Bonneau P, Cordingley M,
545 Coulombe R, Duan J, Edwards P, et al. Preclinical profile of BI 224436, a novel HIV-
546 1 non-catalytic-site integrase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:3233-
547 44.
- 548 10. Le Rouzic E, Bonnard D, Chasset S, Bruneau JM, Chevreuil F, Le Strat F, Nguyen J,
549 Beauvoir R, Amadori C, Brias J, et al. Dual inhibition of HIV-1 replication by
550 integrase-LEDGF allosteric inhibitors is predominant at the post-integration stage.
551 *Retrovirology.* 2013;10:144.
- 552 11. Christ F, Shaw S, Demeulemeester J, Desimmie BA, Marchand A, Butler S, Smets
553 W, Chaltin P, Westby M, Debyser Z, Pickford C. Small-molecule inhibitors of the
554 LEDGF/p75 binding site of integrase block HIV replication and modulate integrase
555 multimerization. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:4365-74.
- 556 12. Desimmie BA, Schrijvers R, Demeulemeester J, Borrenberghs D, Weydert C, Thys
557 W, Vets S, Van Remoortel B, Hofkens J, De Rijck J, et al. LEDGINS inhibit late stage
558 HIV-1 replication by modulating integrase multimerization in the virions.
559 *Retrovirology.* 2013;10:57.
- 560 13. Jurado KA, Wang H, Slaughter A, Feng L, Kessl JJ, Koh Y, Wang W, Ballandras-
561 Colas A, Patel PA, Fuchs JR, et al. Allosteric integrase inhibitor potency is

562 determined through the inhibition of HIV-1 particle maturation. Proc Natl Acad Sci U
563 S A. 2013;110:8690-5.

564 14. Fontana J, Jurado KA, Cheng N, Ly NL, Fuchs JR, Gorelick RJ, Engelman AN,
565 Steven AC. Distribution and Redistribution of HIV-1 Nucleocapsid Protein in
566 Immature, Mature, and Integrase-Inhibited Virions: a Role for Integrase in Maturation.
567 J Virol. 2015;89:9765-80.

568 15. Girard MP, Osmanov S, Assossou OM, Kieny MP. Human immunodeficiency virus
569 (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: a review. Vaccine.
570 2011;29:6191-218.

571 16. Garcia F, Routy JP. Challenges in dendritic cells-based therapeutic vaccination in
572 HIV-1 infection Workshop in dendritic cell-based vaccine clinical trials in HIV-1.
573 Vaccine. 2011;29:6454-63.

574 17. Garcia F, Climent N, Guardo AC, Gil C, Leon A, Autran B, Lifson JD, Martinez-
575 Picado J, Dalmau J, Clotet B, et al. A dendritic cell-based vaccine elicits T cell
576 responses associated with control of HIV-1 replication. Sci Transl Med.
577 2013;5:166ra2.

578 18. Chasset S, Chevreuil F, Ledoussal B, Le Strat F, Benarous R. Inhibitors of viral
579 replication, their process of preparation and their therapeutical uses. 2014; WO
580 2014/053666 A1.

- 581 19. van Bel N, van der Velden Y, Bonnard D, Le Rouzic E, Das AT, Benarous R,
582 Berkhout B. The allosteric HIV-1 integrase inhibitor BI-D affects virion maturation but
583 does not influence packaging of a functional RNA genome. PLoS One.
584 2014;9:e103552.
- 585 20. Das AT, Klaver B, Harwig A, Vink M, Ooms M, Centlivre M, Berkhout B. Construction
586 of a doxycycline-dependent simian immunodeficiency virus reveals a
587 nontranscriptional function of tat in viral replication. J Virol. 2007;81:11159-69.
- 588 21. Maudru T, Peden KW. Adaptation of the fluorogenic 5'-nuclease chemistry to a PCR-
589 based reverse transcriptase assay. Biotechniques. 1998;25:972-5.
- 590 22. Moog C, Dereuddre-Bosquet N, Teillaud JL, Biedma ME, Holl V, Van Ham G,
591 Heyndrickx L, Van Dorselaer A, Katinger D, Vcelar B, et al. Protective effect of
592 vaginal application of neutralizing and nonneutralizing inhibitory antibodies against
593 vaginal SHIV challenge in macaques. Mucosal Immunol. 2014;7:46-56.
- 594 23. Wu X, Yang ZY, Li Y, Hogerkorp CM, Schief WR, Seaman MS, Zhou T, Schmidt SD,
595 Wu L, Xu L, et al. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human
596 monoclonal antibodies to HIV-1. Science. 2010;329:856-61.
- 597 24. Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, Goss JL, Wrin T, Simek
598 MD, Fling S, Mitcham JL, et al. Broad and potent neutralizing antibodies from an
599 African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. Science. 2009;326:285-9.

- 600 25. Zhou T, Xu L, Dey B, Hessel AJ, Van Ryk D, Xiang SH, Yang X, Zhang MY, Zwick
601 MB, Arthos J, et al. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-
602 1 gp120. *Nature*. 2007;445:732-7.
- 603 26. Trkola A, Purtscher M, Muster T, Ballaun C, Buchacher A, Sullivan N, Srinivasan K,
604 Sodroski J, Moore JP, Katinger H. Human monoclonal antibody 2G12 defines a
605 distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human
606 immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1996;70:1100-8.
- 607 27. Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, Ruker F, Katinger H.
608 A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J*
609 *Virol*. 1993;67:6642-7.
- 610 28. Stiegler G, Kunert R, Purtscher M, Wolbank S, Voglauer R, Steindl F, Katinger H. A
611 potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope
612 on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*.
613 2001;17:1757-65.
- 614 29. Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer C, Saphire EO, Binley JM, Moore JP,
615 Stiegler G, Katinger H, Burton DR, Parren PW. Broadly neutralizing antibodies
616 targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus
617 type 1 glycoprotein gp41. *J Virol*. 2001;75:10892-905.

- 618 30. Lorin V, Mouquet H. Efficient generation of human IgA monoclonal antibodies. *J*
619 *Immunol Methods*. 2015;422:102-10.
- 620 31. Kwong PD, Mascola JR. Human antibodies that neutralize HIV-1: identification,
621 structures, and B cell ontogenies. *Immunity*. 2012;37:412-25.
- 622 32. Burrer R, Haessig-Einius S, Aubertin AM, Moog C. Neutralizing as well as non-
623 neutralizing polyclonal immunoglobulin (Ig)G from infected patients capture HIV-1 via
624 antibodies directed against the principal immunodominant domain of gp41. *Virology*.
625 2005;333:102-13.
- 626 33. Nyambi PN, Burda S, Bastiani L, Williams C. A virus binding assay for studying the
627 antigenic landscape on intact, native, primary human immunodeficiency virus-type 1.
628 *J Immunol Methods*. 2001;253:253-62.
- 629 34. Climent N, Guerra S, Garcia F, Rovira C, Miralles L, Gomez CE, Pique N, Gil C,
630 Gatell JM, Esteban M, Gallart T. Dendritic cells exposed to MVA-based HIV-1
631 vaccine induce highly functional HIV-1-specific CD8(+) T cell responses in HIV-1-
632 infected individuals. *PLoS One*. 2011;6:e19644.
- 633 35. Peden K, Emerman M, Montagnier L. Changes in growth properties on passage in
634 tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1LAI, HIV-
635 1MAL, and HIV-1ELI. *Virology*. 1991;185:661-72.

- 636 36. Lu K, Heng X, Summers MF. Structural determinants and mechanism of HIV-1
637 genome packaging. *J Mol Biol.* 2011;410:609-33.
- 638 37. Das AT, Klaver B, Berkhout B. Reduced replication of human immunodeficiency virus
639 type 1 mutants that use reverse transcription primers other than the natural
640 tRNA(3Lys). *J Virol.* 1995;69:3090-7.
- 641 38. Bender A, Bui LK, Feldman MA, Larsson M, Bhardwaj N. Inactivated influenza virus,
642 when presented on dendritic cells, elicits human CD8+ cytolytic T cell responses. *J*
643 *Exp Med.* 1995;182:1663-71.
- 644 39. Larsson M, Fonteneau JF, Lirvall M, Haslett P, Lifson JD, Bhardwaj N. Activation of
645 HIV-1 specific CD4 and CD8 T cells by human dendritic cells: roles for cross-
646 presentation and non-infectious HIV-1 virus. *AIDS.* 2002;16:1319-29.
- 647 40. Buseyne F, Le Gall S, Boccaccio C, Abastado JP, Lifson JD, Arthur LO, Riviere Y,
648 Heard JM, Schwartz O. MHC-I-restricted presentation of HIV-1 virion antigens
649 without viral replication. *Nat Med.* 2001;7:344-9.
- 650 41. Guardo AC, Alvarez-Fernandez C, Arberas H, Garcia-Perez J, Garcia F, Bargallo
651 ME, Maleno MJ, Gatell JM, Mothe B, Alcamí J, et al. Use of RT-defective HIV virions:
652 new tool to evaluate specific response in chronic asymptomatic HIV-infected
653 individuals. *PLoS One.* 2013;8:e58927.

- 654 42. Vranckx LS, Demeulemeester J, Saleh S, Boll A, Vansant G, Schrijvers R, Weydert
655 C, Battivelli E, Verdin E, Cereseto A, et al. LEDGIN-mediated Inhibition of Integrase-
656 LEDGF/p75 Interaction Reduces Reactivation of Residual Latent HIV. EBioMedicine.
657 2016; 10.1016/j.ebiom.2016.04.039.
- 658 43. Mesplède T, Wainberg MA. Will LEDGIN molecules be able to play a role in a cure
659 for HIV infection? EBioMedicine. 2016; 10.1016/j.ebiom.2016.05.007.

660

661 **Figure legends:**

662

663 **Figure 1. Impact of MUT-A on HIV-1 replication and production. A.** Chemical structure of
664 MUT-A. **B.** SupT1 cells were infected with HIV-1 LAI and cultured in the absence or
665 presence of MUT-A (160 nM, 5x EC50). **C.** Protocol of HIV-1 production upon transfection of
666 293T cells with HIV-1 LAI plasmid, cultured with or without MUT-A. **D.** Virus produced in the
667 presence of absence of MUT-A was measured by CA-p24 ELISA after 48 h. Mock treated
668 cells were transfected with control plasmid pBluescript-SK+. Average values with SD are
669 shown (N=3). **E.** Protein content of HIV-1 produced in the presence or absence of MUT-A
670 estimated by western blot using antibodies against Gag, Env, RT and IN viral proteins from
671 HIV-1, and compared with virus produced in the presence of the protease inhibitor
672 Saquinavir. **F.** The virus stocks produced in the presence or absence of MUT-A were used

673 for infection of SupT1 T cells. No additional MUT-A was added during culturing. The CA-p24
674 level in the culture medium was monitored by ELISA.

675

676 **Figure 2: HIV-1 RNA packaging and dimerization.** Viral RNA was isolated from virion
677 particles produced in the presence or absence of MUT-A. For mock samples, RNA was
678 isolated from pBluescript-SK+ transfected cells. **A.** Virus RNA was analyzed on a denaturing
679 northern blot to measure RNA packaging. The position of the full-length 9 kb viral genome is
680 indicated. **B.** Quantification of the 9-kb viral RNA detected in panel A. The average value
681 (N=3) with SD is shown. **C.** Virus RNA was analyzed on a non-denaturing northern blot to
682 analyze the dimerization status. The position of the dimer and monomer are indicated. To
683 identify the position of the monomer, the viral RNA samples were incubated at 56°C for 10
684 min before analysis. **D.** The monomer and dimer bands observed in panel C were quantified
685 to measure the level of dimerization. The average value with SD is shown (N=3).

686

687 **Figure 3. Thermal stability of HIV-1 RNA dimers from viruses cultured in presence or**
688 **absence of MUT-A.** **A.** Virion-derived RNAs were heated for 10 min at increasing
689 temperatures (40, 43, 46, 48, 50, 52, 54, 57 and 60°C) before analysis on a non-denaturing
690 northern blot. The dimer and monomer positions are indicated. **B.** The monomer and dimer

691 RNA bands observed in panel A were quantified to calculate the level of RNA dimerization at
692 each temperature.

693

694 **Figure 4. Activity of virus-extracted Reverse transcriptase.** HIV-1 was produced with or
695 without MUT-A. Virus supernatant was incubated with an MS2 RNA template and dNTPs to
696 reverse transcribe the template RNA. The activity of the RT enzyme was determined by
697 quantitation of the cDNA product by qPCR. Serial dilutions of AMV-RT were used to
698 generate a standard curve. Average values with SD are shown (N=2). Mock: supernatant of
699 cells transfected with control plasmid, pBluescript-SK+.

700

701 **Figure 5. tRNA^{lys3} occupancy of the HIV-1 RNA.** HIV-1 RNA-tRNA^{lys3} complexes were
702 isolated from virions produced in the presence or absence of MUT-A and analyzed by primer
703 extension. Extension of the natural tRNA^{lys3} primer bound to the PBS yields a product of
704 257 nt. Extension of a heat-annealed CN1 primer results in a product of 151 nt. **A.** Both
705 tRNA^{lys3} and CN1 primers were extended by addition of exogenous HIV-1 RT (p66/51)
706 enzyme and dNTPs. The resulting DNA products were run on a denaturing polyacrylamide
707 gel. Lanes of one gel were merged. **B.** Schematic showing the primer extension assay. **C.**
708 Quantification of the 257-nt band produced by the natural tRNA^{lys3} primer. **D.** Quantification
709 of the 151-nt band produced by the DNA primer CN1. **E.** tRNA^{lys3} occupancy of the PBS

710 was determined by calculating the tRNA to CN1 product ratio. The average value with SD is
711 shown (N = 4). Mock: the RNA isolation procedure was performed on the supernatant of
712 cells transfected with control plasmid pBluescript-SK+.

713

714 **Figure 6: Immunoreactivity of HIV-1 produced in the presence or absence of MUT-A.**

715 **A.** Schematic of the antibody capture assay of native HIV-1 particles produced. The capacity
716 of the different antibodies to capture native HIV-1 particles was assessed by ELISA. HIV-1
717 particles retained by the antibodies were lysed and quantified by CA-p24 detection by
718 ELISA. **B.** The different monoclonal and polyclonal antibodies used in virus-capture assays
719 are listed together with their specific target and their ability to neutralize HIV-1. Nonspecific
720 antibodies (polyclonal IgG HIV- and mAb Syn = Synagis) were used as negative controls. **C.**
721 Quantitation by CA-p24 ELISA of native HIV-1 particles produced in the presence (red bars)
722 or absence (blue bars) of MUT-A that have been captured with the different antibodies used
723 at three different concentrations.

724

725 **Figure 7: T-cell proliferation induced by autologous MDDCs exposed to MUT-A-**

726 **inactivated HIV-1 assessed by CFSE proliferation assay.** Proliferation in response to
727 autologous MDDCs exposed to wt HIV-1 (NL4.3 DMSO) or MUT-A or AT-2 inactivated HIV-1
728 in a 6-day co-culture was assessed in triplicates using the CFSE proliferation assay. MDDCs

729 were pulsed with virus particles corresponding to 1 µg/ml of HIV-1 Gag CA-p24. A
730 representative (out of 3 independent experiments) flow cytometry dot plots showing
731 lymphocyte gating strategy by FSC/SSC and CD3+ positive staining, as well as dot plots
732 showing CFSE dilution in gated CD3+ CD4+ T lymphocytes after in vitro stimulation with the
733 above mentioned virus or negative (medium) and positive SEA controls.

734

735 **Figure 8: CD4+ and CD8+ T-cell proliferation induced by autologous MDDCs exposed**

736 **to MUT-A-inactivated HIV-1. A.** Proliferation in response to autologous MDDC exposed to

737 wt HIV-1 (NL4.3 DMSO) or MUT-A inactivated HIV-1 or AT-2-inactivated HIV-1 in a 6-day

738 co-culture was assessed in triplicates using the CFSE proliferation assay. MDDCs were

739 pulsed with either 5 µg/ml HIV-1 (NL4.3 DMSO or MUT-A) or 1 µg/ml HIV-1 (NL4.3 AT-2) of

740 HIV-1 gag CA-p24. A representative (out of 3 independent experiments) flow cytometry dot

741 plots showing CFSE dilution in gated CD3+ CD4+ and CD3+ CD8+ T lymphocytes after in

742 vitro stimulation with the above mentioned viruses or negative (medium) and positive SEA

743 controls. **B and C.** Quantitation of T CD4+ (**B**) and CD8+ (**C**) proliferation in response to

744 autologous MDDC exposed to wt HIV virus (NL4.3 DMSO) or inactivated HIV virus (MUT-A

745 or NL4.3 AT-2) in a 6-day co-culture was assessed in triplicates using the CFSE proliferation

746 assay. In all virus used, MDDCs were pulsed with one µg/ml of HIV gag CA-p24. Graph

747 showing mean +/- SD of percentages of CFSE low CD3+ CD4+ (**B**) and CD3+ CD8+ (**C**) T
748 cells from 3 different co-cultures are represented.

749

750 **Figure 9: Cytokine secretion induced by autologous MDDCs exposed to MUT-A-**

751 **inactivated HIV-1.** Cytokine and chemokine secretion in response to autologous MDDCs

752 exposed to wt HIV-1 (NL4.3 DMSO) or MUT-A-inactivated HIV-1 (MUT-A 1uM) in

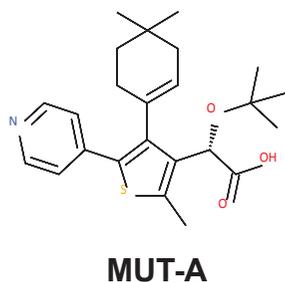
753 supernatants from a 6-day co-culture was assessed in duplicates by Luminex assay. Graph

754 representing mean +/- SD concentrations (pg/ml) of IL-12 (**A**), IFN-gamma (**B**), IL2-R (**C**),

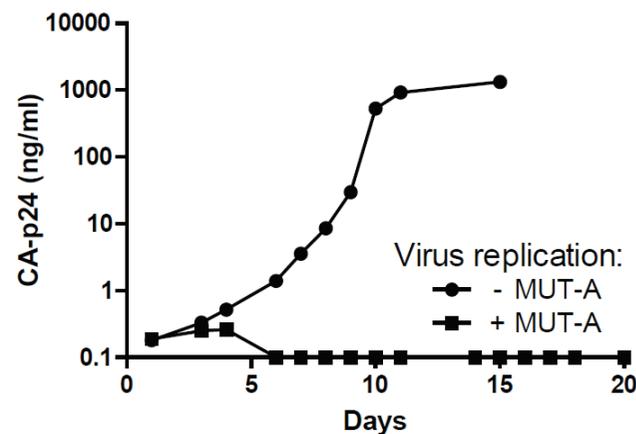
755 and MIP-1beta (**D**) analyzed after 3 different co-cultures.

Figure 1

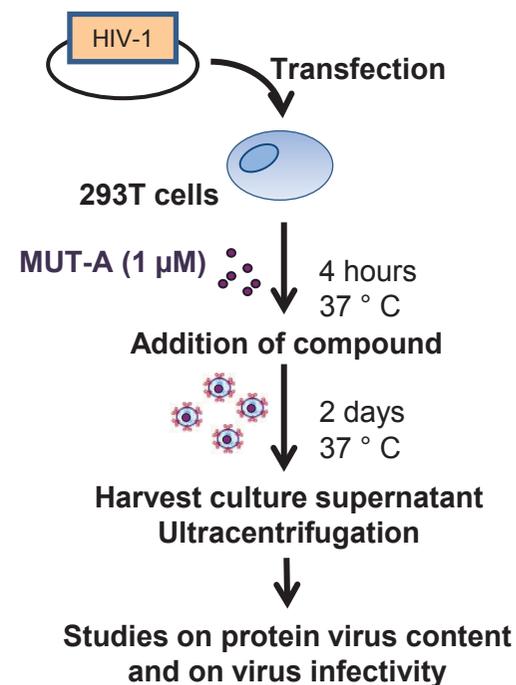
A



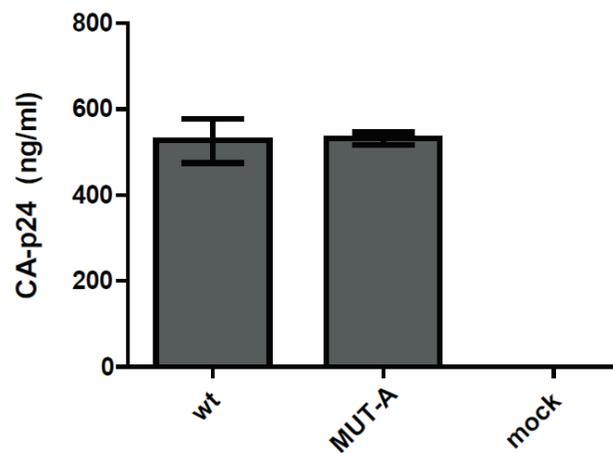
B



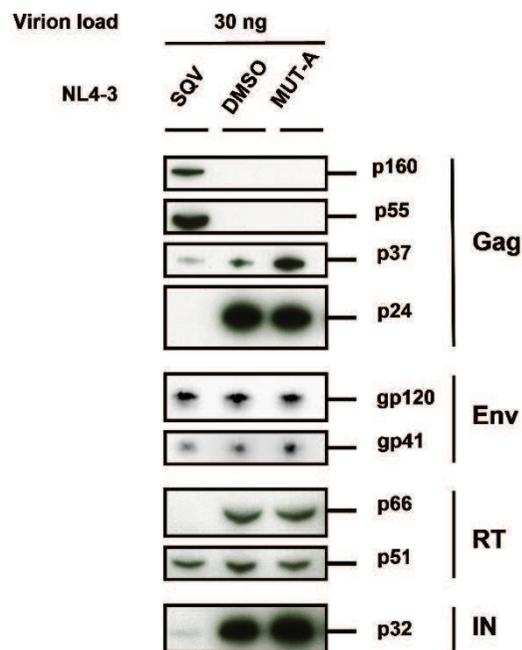
C



D



E



F

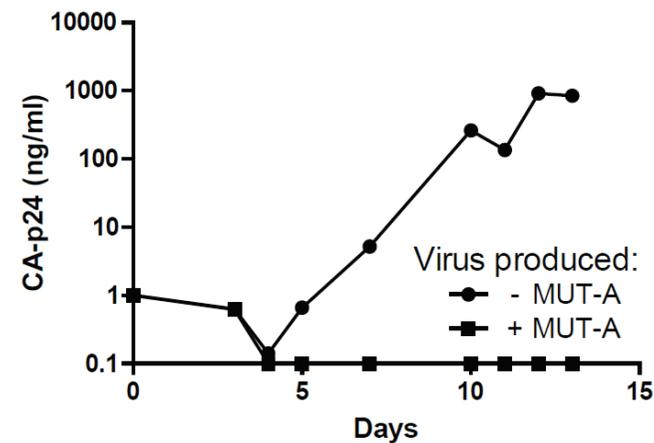


Figure 2

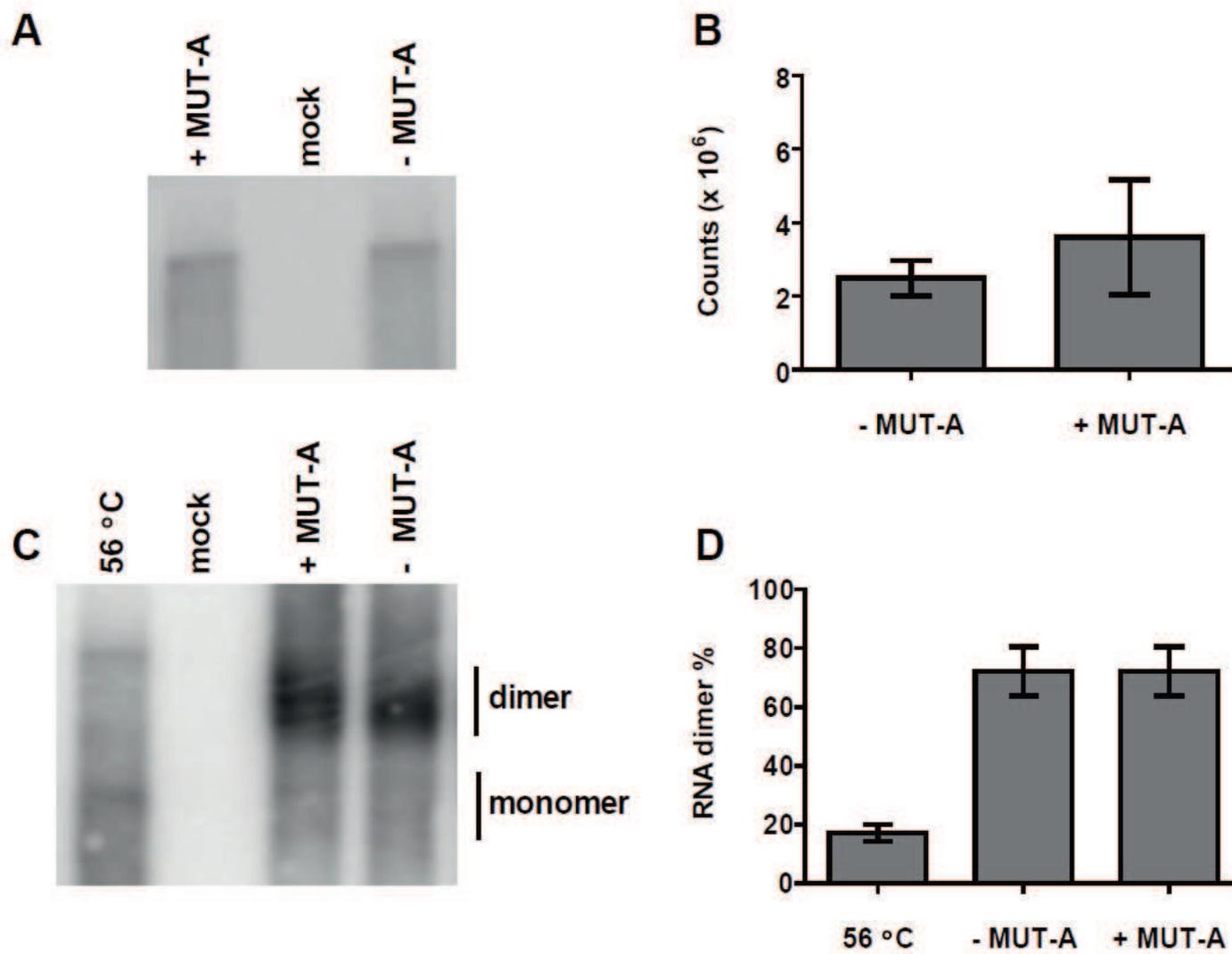


Figure 3

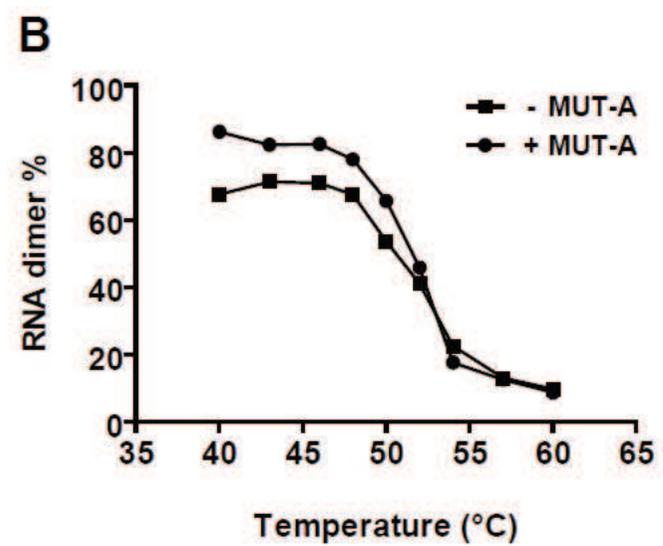
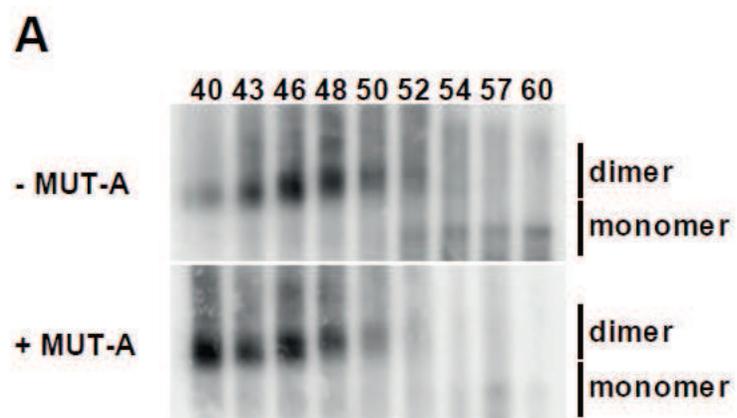


Figure 4

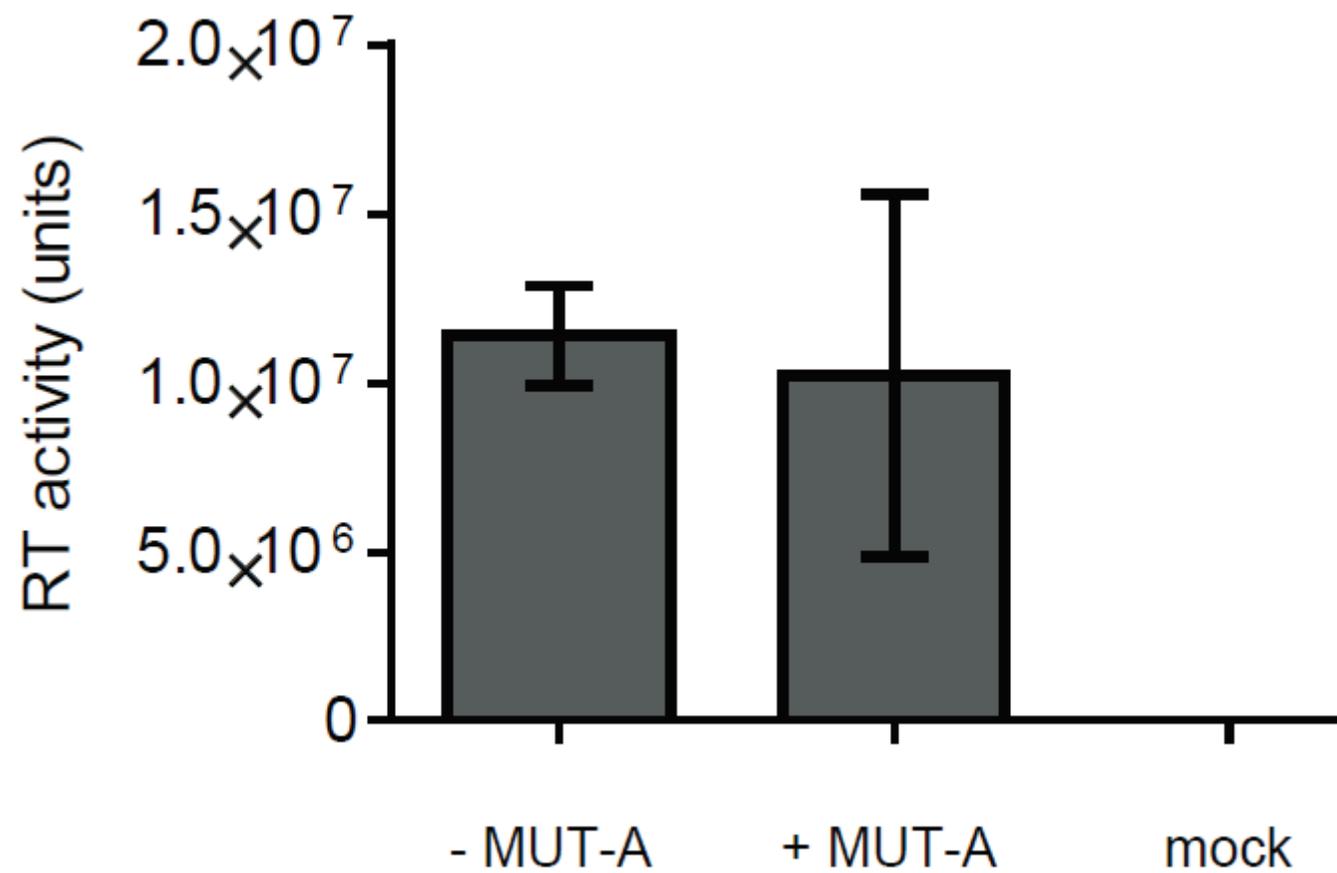
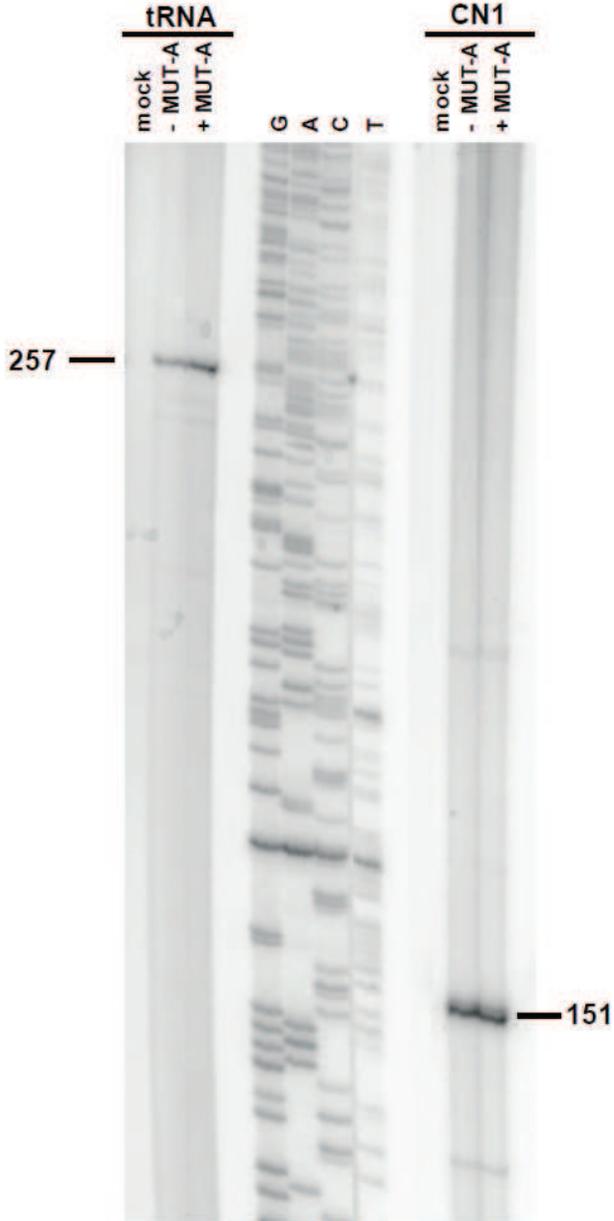
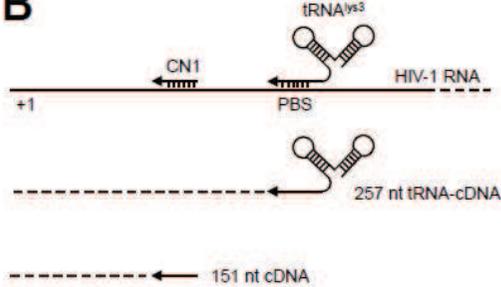


Figure 5

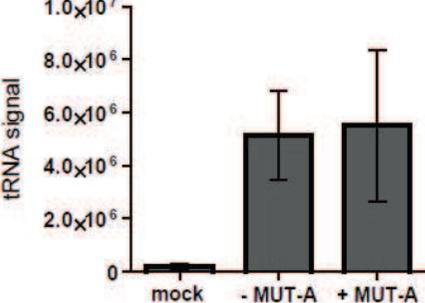
A



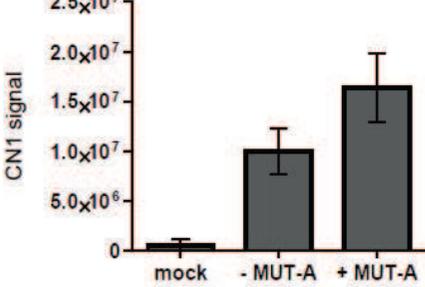
B



C



D



E

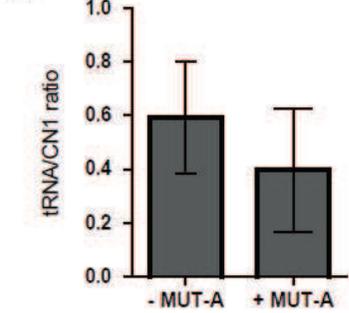
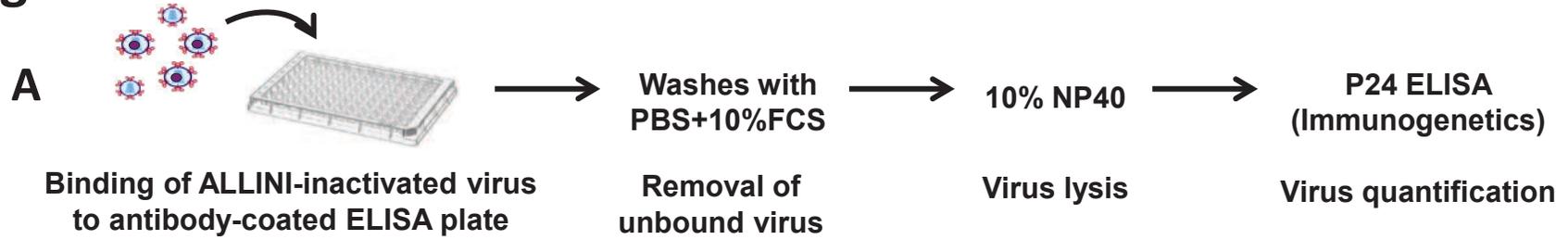


Figure 6



B

	Name	Binding site	Neutralizing activity
Poly-clonal	Purified IgG HIV+ (F6 Gri/Ly)		+
	Purified IgG HIV-	Negative control	Irrelevant
Mono-clonal	b12	CD4 bs	+
	2G12	MPER (gp41)	+
	4D4	gp41	-
	PGT121	V3	+
	10/1074	V3	+
	10E8	MPER (gp41)	+
	VRC01	CD4 bs	+
	Syn (Synagis)	Negative control	Irrelevant

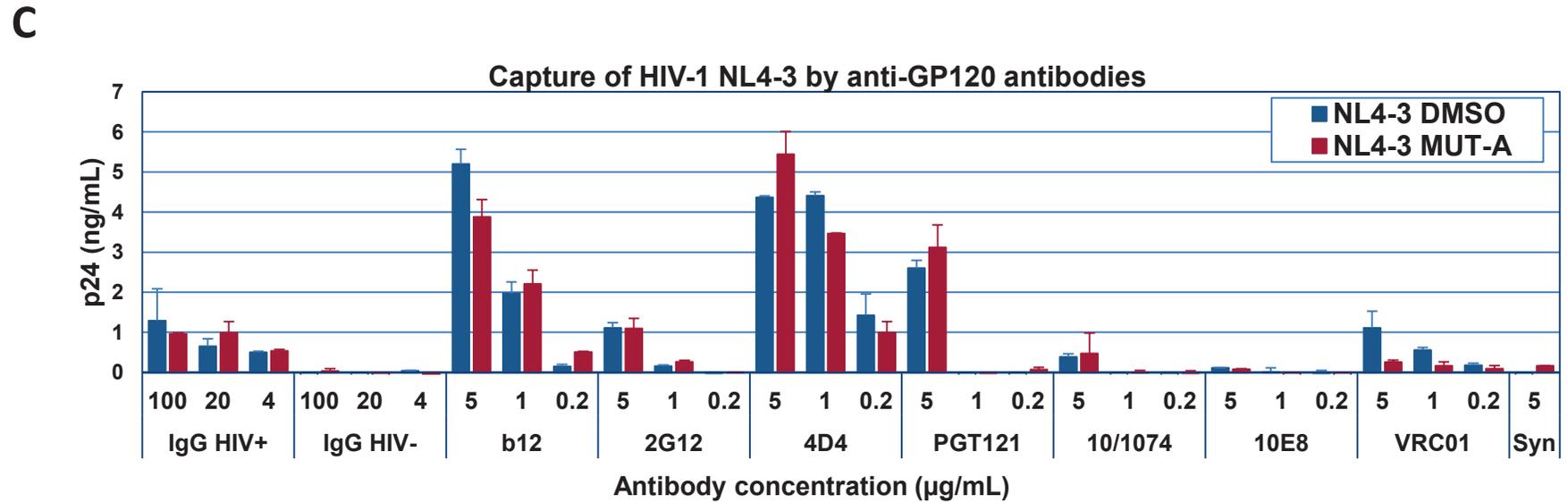


Figure 7

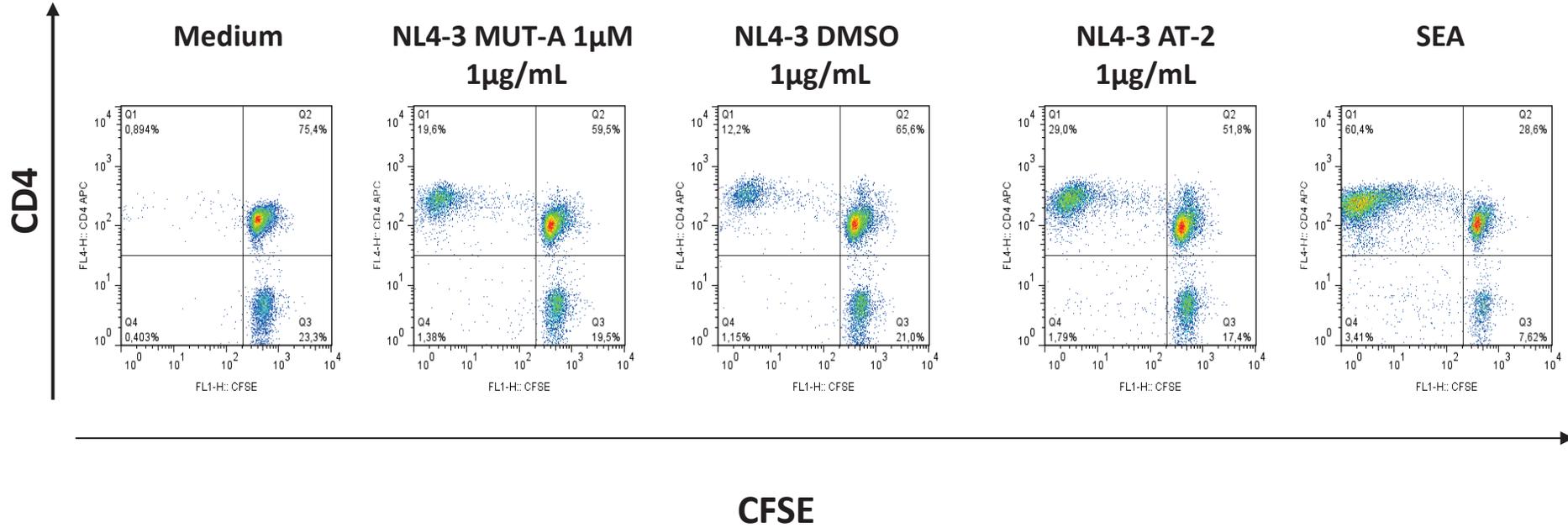
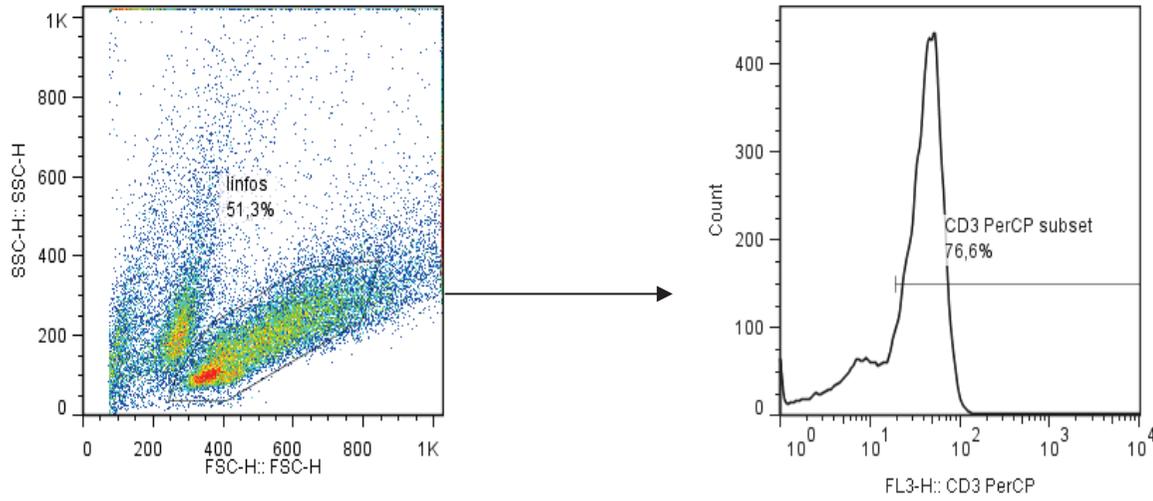
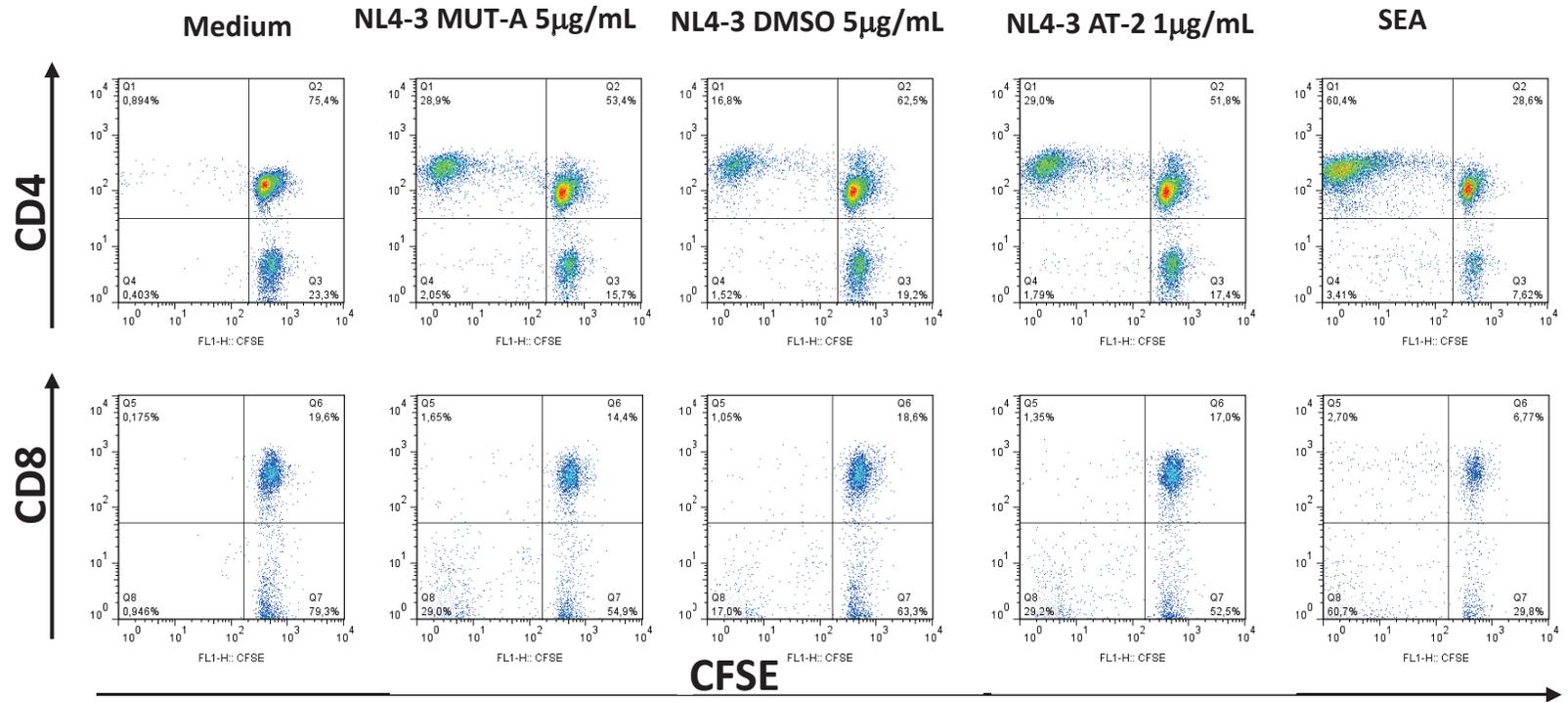
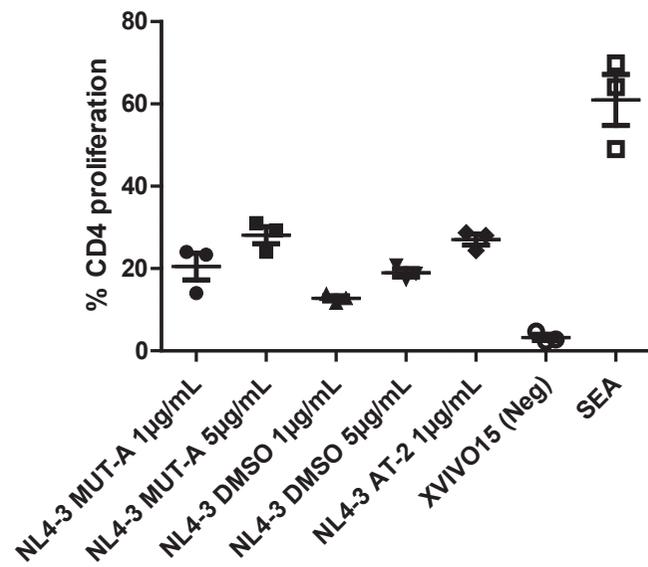


Figure 8

A



B



C

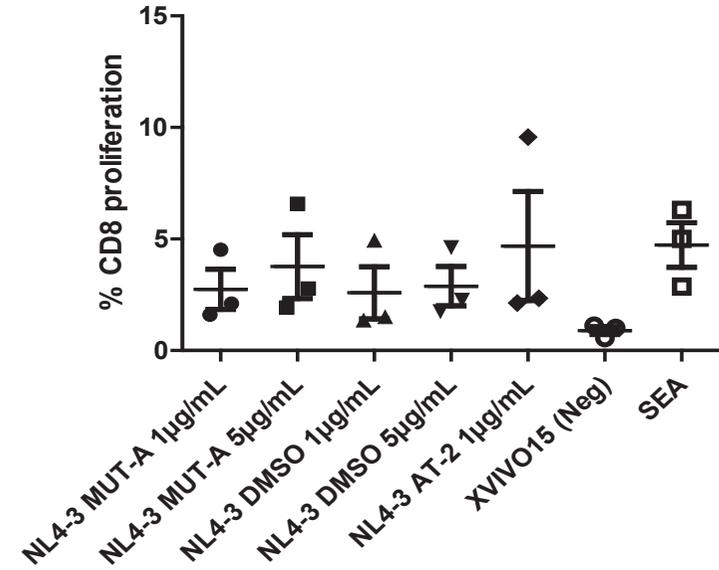
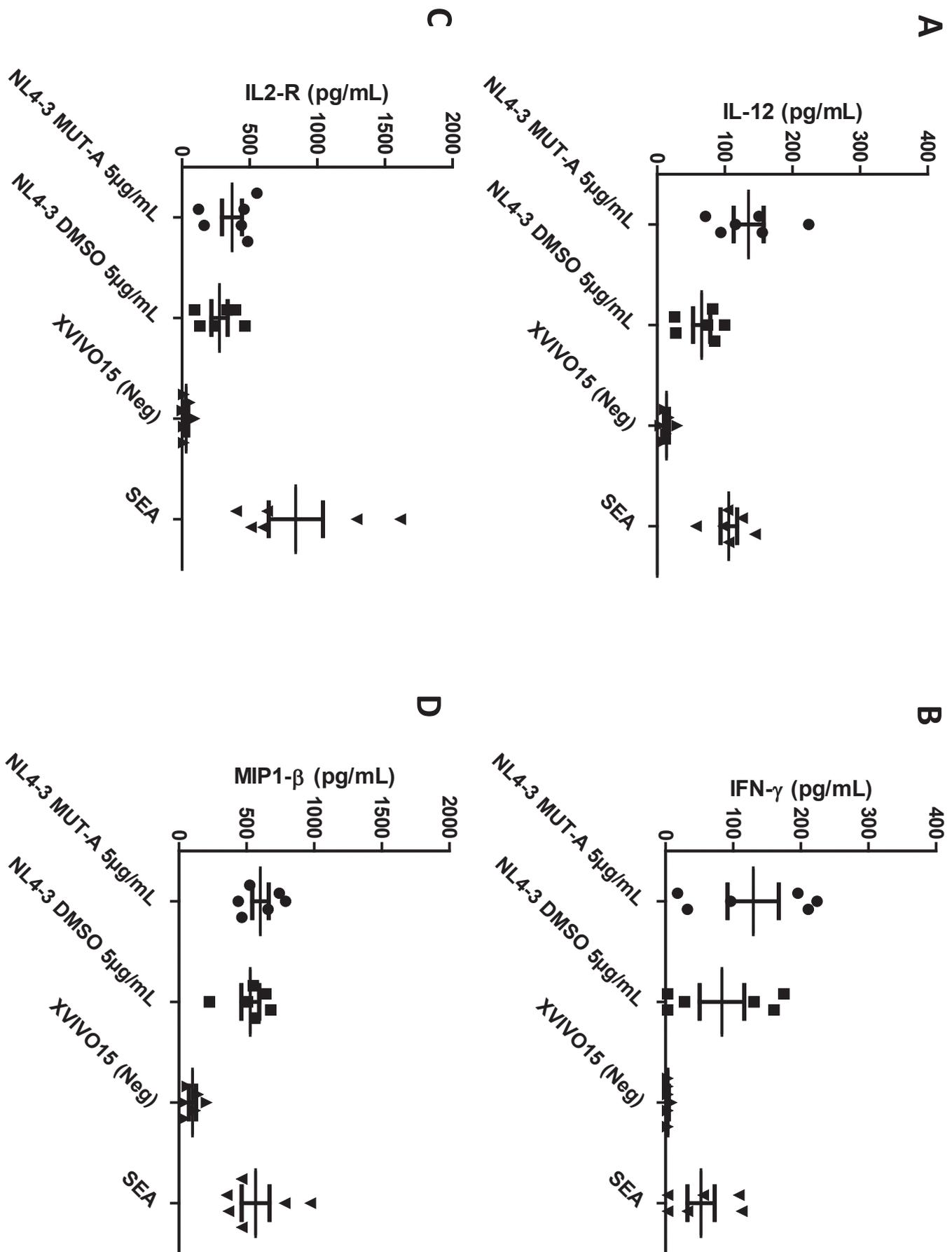


Figure 9



III - Evaluation de l'activité antirétrovirale de différents INLAIs sur la réplication du SIV

L'infection expérimentale SIV de macaques, est un modèle qui permet d'accroître considérablement les connaissances sur la réponse immunitaire associée à l'infection VIH-1, notamment en présence de traitement ART, car elle induit le même spectre de troubles immunitaires que ceux observés chez l'Homme suite à l'infection VIH-1. Afin de pouvoir envisager à plus long terme de telles études dans un modèle simien, il est essentiel de tester le spectre d'activité de ces INLAIs sur la réplication du SIVmac. Les enzymes virales IN VIH-1 et SIV possèdent la même architecture protéique, elles sont composées du domaine N-terminal (NTD), du domaine central (CCD) contenant le site actif D₆₄, D₁₁₆, E₁₅₂ et du domaine C-terminal (CTD). Il s'agit de protéines très conservées parmi l'ensemble des rétrovirus et l'interaction IN-LEDGF joue un rôle crucial dans l'étape d'intégration de la plupart des lentivirus animaux. Le domaine le plus conservé entre les IN VIH-1 NL4-3 et SIVmac 239 est le CCD avec 60% d'identité de séquence. Néanmoins des différences sur les résidus impliqués de manière directe ou indirecte dans l'interaction avec LEDGF sont observées ce qui suggère que l'activité antirétrovirale des INLAIs, ciblant l'interface IN-LEDGF, observée sur la réplication du VIH-1 pourrait être différente contre d'autres lentivirus tel que le SIV.

A - Les INLAIs inhibent la liaison LEDGF sur IN SIV *in vitro*

Les INLAIs étant des inhibiteurs de l'interaction entre l'intégrase et son cofacteur LEDGF, nous avons utilisé une technique de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) en temps résolu : HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence) [436] afin de tester leur activité sur l'interaction *in vitro* de l'IN du VIH-1 ou du SIV avec LEDGF.

Dans un premier temps, des protéines recombinantes IN marquées ont dû être produites. Grâce à un don de l'équipe de P. Cherepanov [437], nous avons disposé d'une construction contenant le gène codant pour l'IN d'un virus de l'immunodéficience simienne de macaques (SIVmac 239) couramment utilisé dans les expérimentations de réplication SIV. Le domaine C-terminal de la protéine IN SIV est fusionné à un épitope 6His. Le plasmide codant pour cette protéine de fusion nommée IN-His SIV est représenté dans la figure 30A. La production de la protéine recombinante a été induite par l'ajout d'IPTG dans des bactéries pLysS transformées avec le plasmide codant pour IN-His SIV (figure 30B) suivi d'une étape de

purification par chromatographie d'affinité. Une protéine recombinante IN VIH-1 marquée 6His en N-terminal (His-IN VIH-1) produite à Mutabilis est utilisée afin de faire le parallèle VIH-1/SIV dans l'ensemble des expérimentations HTRF réalisées par la suite.

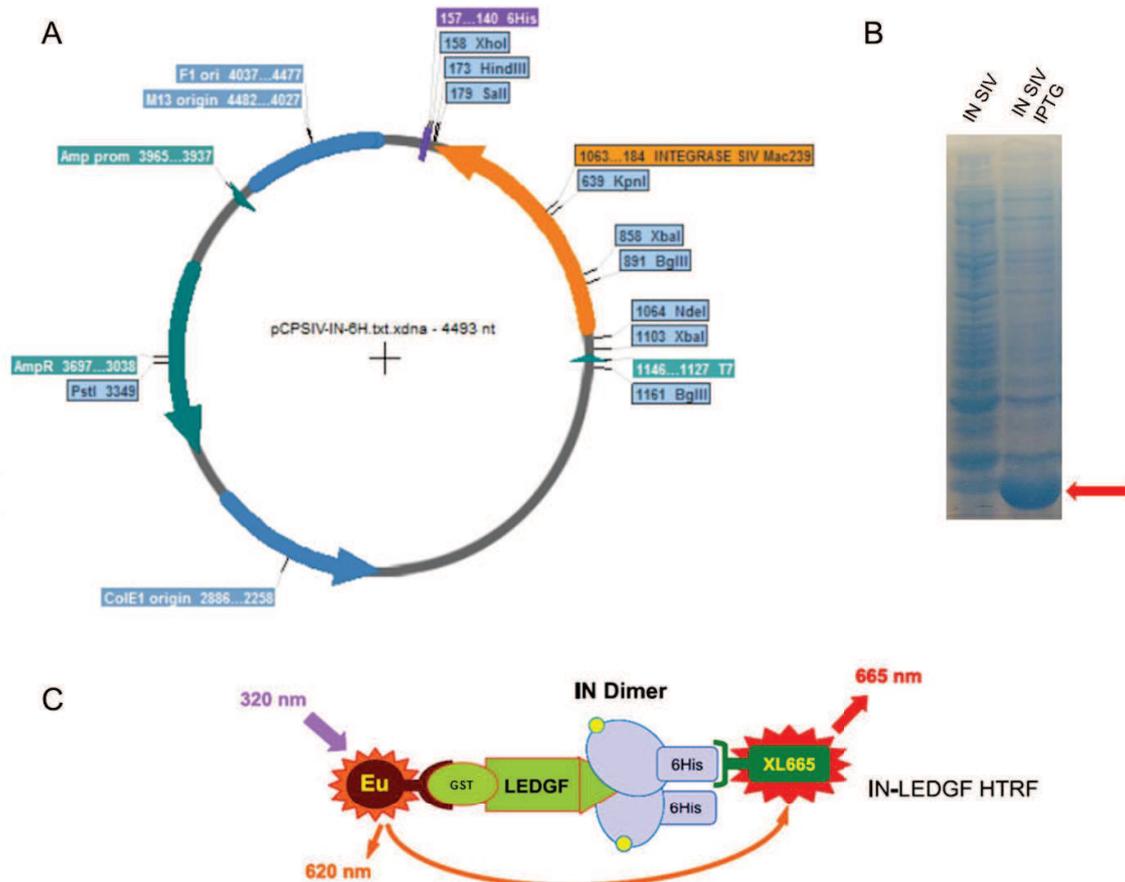


Figure 30 : Production de protéine IN-His SIV et principe du test d'interaction LEDGF-IN *in vitro*. (A) le plasmide codant pour la protéine IN du SIVmac 239 marquée 6His a été utilisé pour (B) la production de la protéine recombinante IN-His SIV. (C) Schéma du principe du test HTRF utilisé pour étudier l'interaction IN-LEDGF *in vitro*.

Brièvement, la technique HTRF permet de quantifier l'interaction entre deux partenaires protéiques potentiels. Elle nécessite l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorophores et reconnaissant dans notre cas les marques GST sur LEDGF et His sur les IN VIH-1 ou SIV. Les fluorophores utilisés sont de deux types, donneur ou accepteur, pour chacune de protéines cibles. Si les protéines testées sont capables d'interagir entre elles, la reconnaissance de chacun des partenaires par les anticorps permet le rapprochement des fluorophores auxquels ils sont couplés. Ainsi la stimulation du fluorophore donneur permet

un transfert de fluorescence au fluorophore accepteur proche et la fluorescence émise par celui-ci peut être mesurée. La distance du complexe protéique globale doit être comprise entre 70 et 90 Å afin de permettre ce transfert de fluorescence. Contrairement au FRET classique, la technique d'HTRF utilise des fluorophores émettant un signal sur des temps longs ce qui permet de diminuer considérablement le bruit de fond. Un schéma récapitulatif du protocole HTRF utilisé pour étudier l'interaction IN-LEDGF *in vitro* est présenté dans la figure 30C.

Des expérimentations de mise au point ont été réalisées afin de déterminer les conditions optimales à utiliser lors de ce test HTRF. Tout d'abord la reconnaissance spécifique des différentes marques, GST pour LEDGF et His pour IN VIH-1 et SIV respectivement, a été vérifiée par compétition (figure 31A). La protéine multi-marquée His-GST-Flag est utilisée comme complexe reconnu par le test HTRF car elle possède les deux marques GST et His ce qui permet ainsi l'émission de fluorescence lors de l'ajout des anticorps HTRF. Si les protéines GST-LEDGF, His-IN VIH-1 ou IN-His SIV sont correctement reconnues par les anticorps HTRF, l'ajout indépendant d'une gamme croissante de ces protéines permet l'inhibition de ce signal par compétition. Pour rappel, l'IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) correspond à la concentration nécessaire d'une molécule pour induire 50% d'inhibition. Dans notre étude les IC₅₀ des protéines GST-LEDGF et His-IN VIH-1 sont équivalentes (respectivement 6 et 13 nM) ce qui signifie qu'elles inhibent la reconnaissance de la protéine His-GST-Flag de manière similaire et qu'elles sont donc reconnues avec la même efficacité par les anticorps HTRF anti-GST ou anti-His respectivement. L'IC₅₀ de la protéine IN-His SIV est un peu plus élevée (53 nM) ce qui suggère qu'elle est un peu moins bien reconnue par l'anticorps HTRF anti-His (figure 31A). Ces observations sont à prendre en compte mais n'empêche pas la suite des expérimentations sur l'interaction IN-LEDGF du SIV car la protéine IN-His SIV est tout de même reconnue par l'anticorps HTRF.

Par la suite, nous avons étudié l'effet de la présence de DMSO ou de détergent (Tween-20) sur l'interaction LEDGF-IN VIH-1 ou SIV. Nous testons cela car les INLAIs synthétisées par Mutabilis sont resuspendues dans du DMSO et que la composition du tampon de réaction HTRF nécessite la présence de détergent, cependant une concentration trop forte de ces réactifs pourraient influencer négativement nos expérimentations. Pour cela les conditions optimisées pour le test HTRF de l'interaction LEDGF-IN VIH-1 par l'équipe travaillant à Mutabilis ont été utilisées en présence de doses croissantes de DMSO ou de Tween-20. De plus, deux types de format HTRF, variables dans l'ordre et le volume de dépôt des différents réactifs, ont été testés. L'ensemble de ces résultats présenté dans les figures 31B-D montre que les deux formats de dépôt sont équivalents et que l'ajout de DMSO ou de Tween-20

n'influe pas de manière drastique le signal HTRF. Ainsi nous avons choisi de nous placer dans un format 2-8-10 (2 μ l de dilution des molécules + 8 μ l de mix His-IN et Ac anti-His + 10 μ l de mix GST-LEDGF et Ac anti-GST) avec des concentrations finales Tween-20 à 0,005% et DMSO à 2,5%. dans la suite de nos expérimentations.

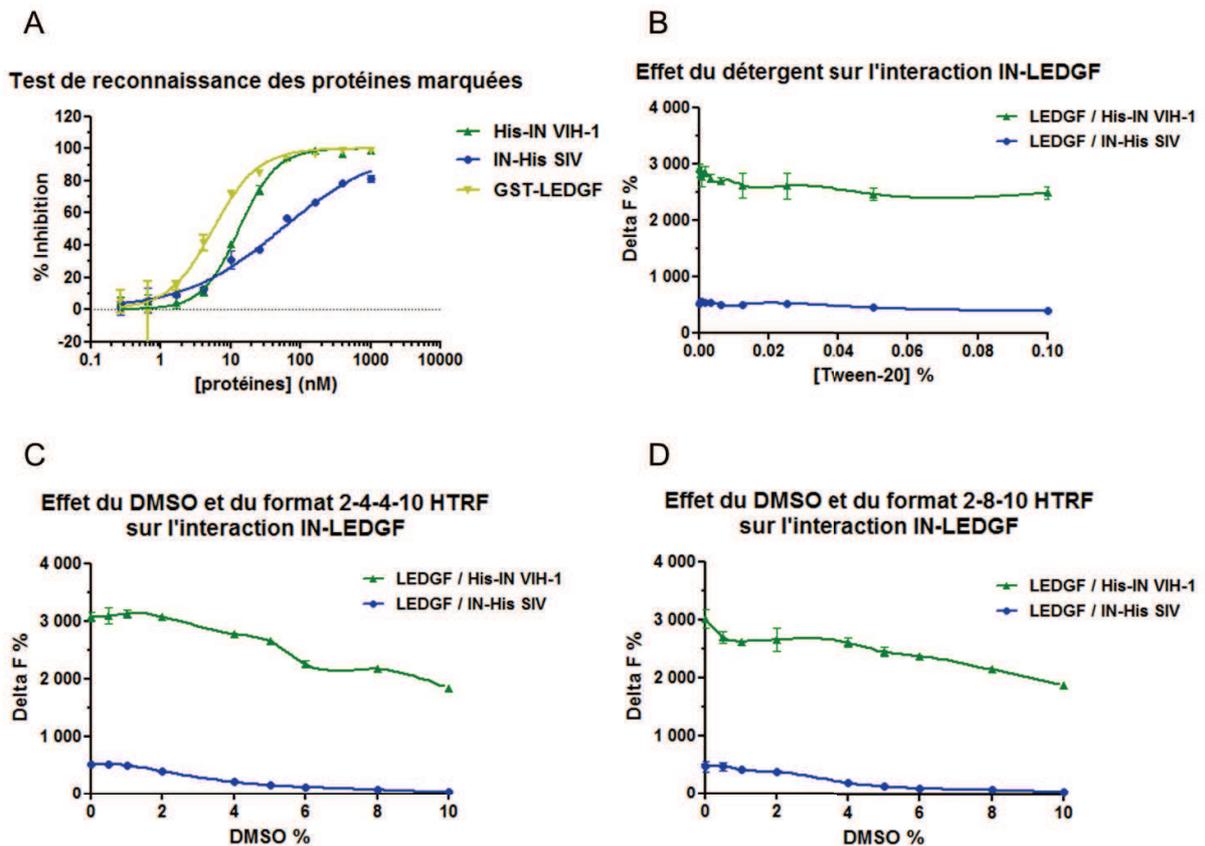


Figure 31 : Mise au point des expérimentations HTRF afin d'étudier l'interaction LEDGF-IN VIH-1 ou SIV *in vitro*.

(A) Capacité des protéines recombinantes marquées GST-LEDGF, His-IN VIH-1 ou IN-His SIV à inhiber la reconnaissance de la protéine multi-marquée His-GST-Flag par les anticorps HTRF anti-GST et anti-His. (B) Effet de la présence dans le tampon HTRF d'une gamme croissant de détergent Tween-20 sur l'interaction LEDGF-IN VIH-1 ou SIV. (C) Test du format de dépôt HTRF 2-4-4-10 : 2 μ l de dilution des molécules + 4 μ l de His-IN + 4 μ l de GST-LEDGF + 10 μ l de mix d'Ac anti-His et d'Ac anti-GST ou (D) format 2-8-10 : 2 μ l de dilution des molécules + 8 μ l de mix His-IN et Ac anti-His + 10 μ l de mix GST-LEDGF et Ac anti-GST. L'effet de l'ajout de DMSO, réactif dans lequel les molécules antirétrovirales sont resuspendues, est étudié en parallèle des deux formats (C et D).

Le Delta F indiqué dans ces figures représente la quantification de l'écart entre les valeurs maximales et minimales obtenues dans chacune des conditions testées. Le delta F observé pour l'interaction LEDGF-IN SIV est environ six fois plus faible que celui de LEDGF-IN VIH-1. Ces observations peuvent être corrélées aux résultats précédents montrant que la protéine IN-His SIV est moins bien reconnue que la protéine His-IN VIH-1 (un facteur 4 est observé entre leur IC50) mais n'indiquent pas que l'interaction LEDGF-IN SIV n'est pas significative.

Afin d'optimiser les conditions d'étude de l'interaction LEDGF-IN SIV nous avons également réalisé des expérimentations de gammes croisées en faisant varier la concentration de chacun des partenaires LEDGF et IN VIH-1 ou SIV ainsi que le couple d'anticorps HTRF donneur/accepteur utilisé.

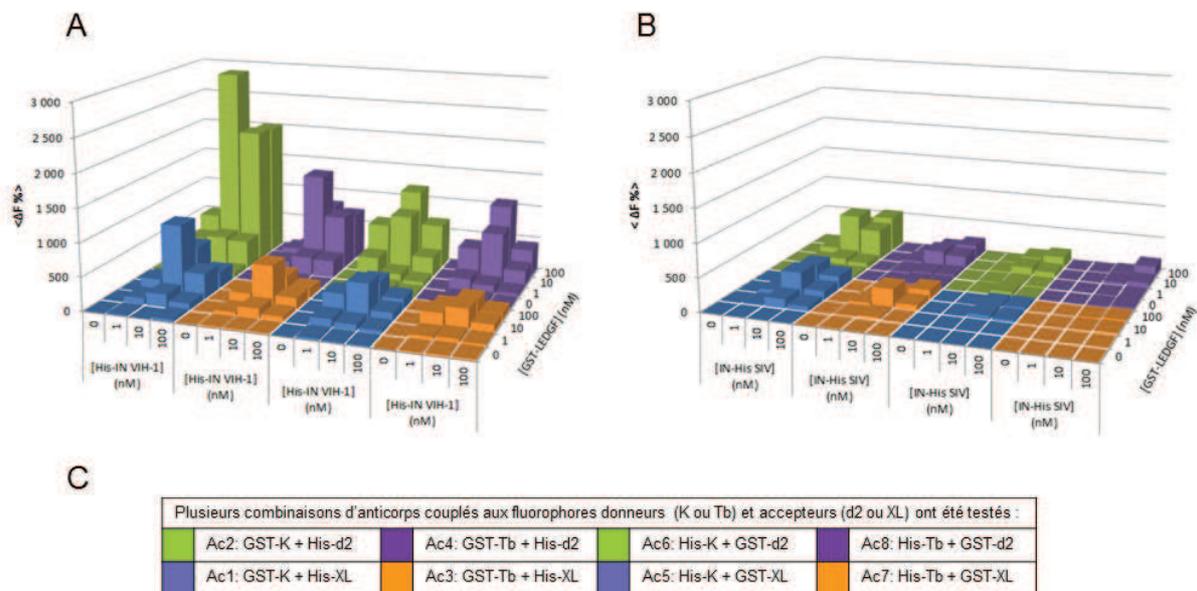


Figure 32 : Interaction LEDGF-IN VIH-1 ou SIV en présence d'une gamme croisée de chacun des partenaires.

Effet de la présence d'une gamme croisée de 1 à 100 nM des protéines GST-LEDGF et His-IN sur des expérimentations HTRF de l'interaction (A) LEDGF-IN VIH-1 et (B) LEDGF-IN SIV. Dans chacune de ces conditions, différents couples potentiels d'anticorps HTRF donneur/accepteur reconnaissant les marques GST ou His ont été testés sont également répertoriés (C).

Les résultats obtenus montrent que le couple d'anticorps GST-K/His-d2, utilisé jusqu'à présent car définit comme optimal pour l'interaction LEDGF-IN VIH-1 dans les résultats préalablement obtenus chez Mutabilis, donne également le plus fort signal HTRF pour

l'interaction avec IN SIV (figure 32). Malgré le fait que le delta F soit beaucoup plus faible que le VIH-1, les meilleurs signaux HTRF sont obtenus en présence des protéines LEDGF ou IN à des concentrations de 10 ou 100 nM pour les deux types de lentivirus. Ainsi nous avons décidé de nous placer dans les conditions équimolaires de 10 nM de chaque partenaire dans la suite de nos expérimentations.

Enfin une expérimentation permettant de tester la spécificité de l'interaction LEDGF-IN SIV observée était essentielle avant de réaliser des tests en présence de composés. Pour cela une protéine Flag-IN VIH-1, interagissant avec LEDGF, est utilisée comme compétiteur. Une gamme croissante de cette protéine est ajoutée afin de déterminer la concentration nécessaire pour dissocier l'interaction entre GST-LEDGF et His-IN VIH-1 ou IN-His SIV reconnue par les anticorps HTRF anti-GST en anti-His. Dans ce test, l'IC₅₀ correspond donc à la concentration de Flag-IN VIH-1 nécessaire pour induire 50% d'inhibition LEDGF-IN de chaque lentivirus. L'IC₅₀ de ce compétiteur sur les interactions de GST-LEDGF avec His-IN VIH-1 ou avec IN-His SIV est équivalente (figure 33A). Cela démontre que malgré le fait que le signal HTRF obtenu avec le SIV soit plus faible, les protéines recombinantes His-IN VIH-1 et IN SIV-His ont une affinité comparable pour GST-LEDGF. Ainsi les effets des INLAIs sur le VIH-1 et le SIV pourront être comparés dans la suite de nos expérimentations. L'effet de la présence de différentes INLAIs a été testé en parallèle sur l'interaction entre la protéine GST-LEDGF avec His-IN VIH-1 d'une part ou IN SIV-His d'autre part dans les conditions équimolaires HTRF optimisées précédemment (figures 31-32).

La société Mutabilis a synthétisé des inhibiteurs allostériques de l'interaction IN-LEDGF provenant de différentes séries chimiques de la famille des aryl ou heteroaryl-tertbutoxy-acetic acid. Nous avons testé huit molécules différentes synthétisées par Mutabilis : 237 (BDM1), 713 (BDM2), 851, 872, 884, 887 et 916 (WO 2014/053666 publié le 10/04/2014). Afin d'observer le spectre d'activité de plusieurs INLAIs sur l'interaction LEDGF-IN SIV et plus loin sur la réplication virale du SIV, nous avons ajouté à notre étude les molécules provenant d'autres familles chimiques : les composés possédant un motif quinoléine BI-D et BI-224436 (Boehringer Ingelheim) [438], le composé Naphtyl GS (Gilead) et la molécule SHG065 (Shionogi). Le composé BI-D étant le premier INLAI à avoir été décrit, il sert donc de molécule de référence dans l'étude d'inhibiteurs de l'interaction IN-LEDGF (INLAIs).

L'ensemble des expérimentations réalisées et les IC₅₀ obtenues sont répertoriés dans le tableau 2. Les pourcentages d'inhibition induits par les composés les plus représentatifs sont représentés dans les figures 33B à F.

A l'exception du composé SHG065 qui possède une IC50 de 2 micromolaires (μM). L'ensemble des INLAIs utilisés est capable d'inhiber *in vitro* l'interaction entre l'IN du VIH-1 et LEDGF avec une IC50 inférieure au μM (tableau 2). Les composés les plus efficaces, aussi bien ceux synthétisés par Mutabilis que par Boehringer Ingelheim ou Gilead, ont une IC50 inférieure à la centaine de nanomolaires (nM).

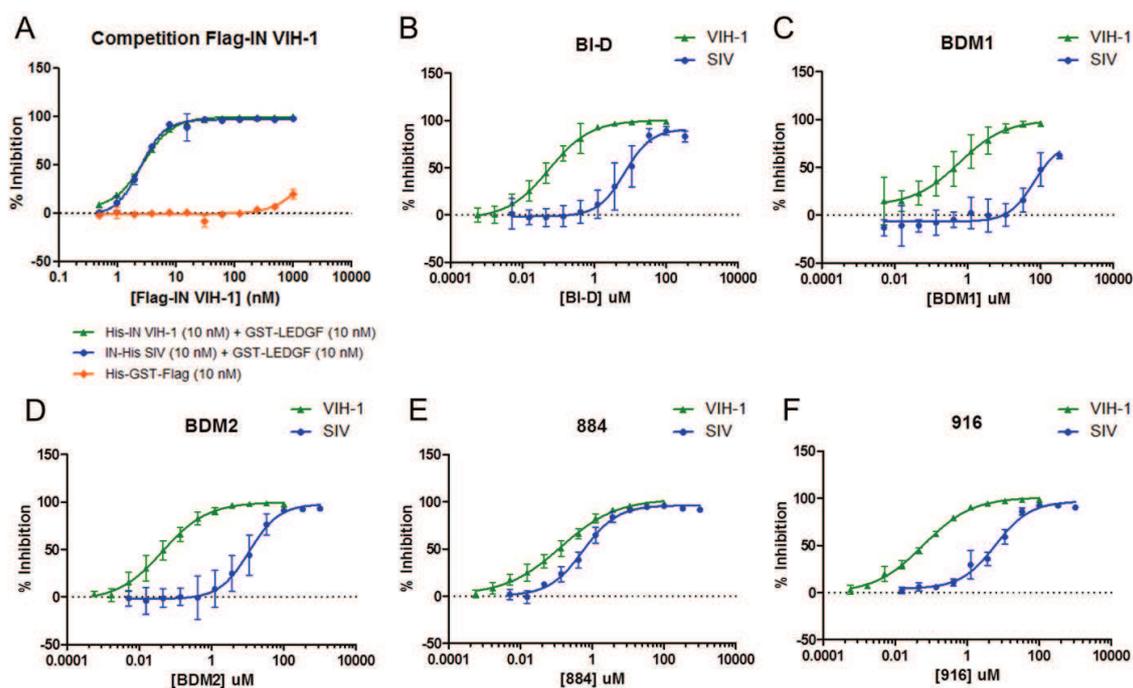


Figure 33 : Interaction *in vitro* entre LEDGF et l'IN du VIH-1 ou du SIV en présence d'INLAIs.

Un test HTRF avec des anticorps reconnaissant les marques GST et His est utilisé. La compétition pour l'interaction avec GST-LEDGF des IN du VIH-1 et SIV marquées His est testée avec une protéine Flag-IN VIH-1 non reconnue (A). Les moyennes des pourcentages d'inhibition de l'interaction LEDGF-IN VIH-1 ou SIV induite par les composés BI-D (B), BDM1 (C), BDM2 (D), 884 (E) et 916 (F) sont représentés. Chaque expérience a été réalisée en duplicat technique. Nombre d'expériences indépendantes $n \geq 3$.

A l'inverse de leur forte activité sur le VIH-1, la majorité de ces inhibiteurs semble beaucoup moins efficace pour inhiber l'interaction *in vitro* entre LEDGF et l'IN du SIV (tableau 2). Pour la molécule de référence BI-D, en comparaison avec les résultats obtenus pour le VIH-1, un décalage de l'IC50 pour le SIV est observé (figure 33B). Il en est de même pour d'autres composés synthétisés par Mutabilis tels que BDM1, BDM2 et 916 (figures 33C, D et F). Pour la plupart des INLAIs utilisés, ce décalage d'IC50 est supérieur à 100 fois. En effet pour ces

composés le ratio IC50 SIV sur IC50 VIH-1 est compris entre 100 et 500 (tableau 2). Ce qui signifie que ces inhibiteurs sont plus d'une centaine de fois moins efficaces pour inhiber *in vitro* l'interaction de LEDGF avec l'IN du SIV qu'avec celle du VIH-1.

Tableau 2 : Activité de différents INLAIs sur l'interaction *in vitro* IN-LEDGF du VIH-1 et du SIV.

Le nombre d'expérimentations réalisées en duplicats, les IC50 sur le VIH-1 et le SIV ainsi que leur rapport SIV/VIH-1 sont répertoriés. Le ratio SIV/VIH-1 est normalisé avec les valeurs moyennes du plateau dans chaque condition. Les molécules ayant un effet similaire sur le VIH-1 et le SIV sont notées en gras.

nom du composé	IC50 VIH-1 (µM)	Intervalle 95% de confiance IC50 VIH-1 (µM)	IC50 SIV (µM)	Intervalle 95% de confiance IC50 SIV (µM)	Ratio SIV/VIH-1
BI-D	0,05	0,044 - 0,067	7	5,48 - 8,89	141
BI-224436	0,08	0,060 - 0,11	13	8,62 - 19,28	153
GS	0,04	0,028 - 0,056	9	5,91 - 13,94	509
SHG065	2	0,96 - 5,29	48	34,54 - 67,02	27
BDM1	0,6	0,32 - 1,05	66	24,70 - 178,7	148
BDM2	0,04	0,035 - 0,054	11	8,33 - 14,55	254
851	0,4	0,25 - 0,50	0,8	0,58 - 1,21	2
871	0,05	0,037 - 0,073	5	3,63 - 5,65	92
872	0,3	0,1843 - 0,5103	3	2,93 - 4,10	12
884	0,1	0,098 - 0,18	0,6	0,46 - 0,67	4
887	0,03	0,020 - 0,051	24	17,99 - 32,62	897
916	0,06	0,049 - 0,074	6	4,57 - 8,09	105

Au contraire, le pourcentage d'inhibition induit par le composé 884 sur l'interaction entre LEDGF et l'IN du VIH-1 ou du SIV est équivalent (figure 33E). En effet le composé 884 possède une IC50 sur le SIV de l'ordre de la centaine de nM, tout comme ce qui est observé sur le VIH-1. Il en est de même pour le composé 851 (tableau 2). Les molécules 851 et 884, synthétisées par Mutabilis, sont donc les seuls composés identifiés dans cette étude comme ayant une efficacité similaire pour inhiber l'interaction LEDGF-IN VIH-1 ou SIV *in vitro*. Cependant il est important que les molécules référencées comme 851 et 884 ont la même

structure chimique. Une étape de purification supplémentaire différencie la molécule 884 de la molécule 851. Ces informations confortent nos résultats car les deux molécules sont capables d'inhiber l'interaction LEDGF-N SIV *in vitro* avec une efficacité similaire, cependant pour la suite de notre étude nous ne sélectionnons que la molécule la plus pure 884.

B - L'efficacité limitée des INLAIs sur la réplication du SIV

Afin d'étudier l'activité de ces différents INLAIs sur la réplication du VIH-1 et du SIV, nous avons réalisé des expérimentations de CellTiter-Glo en multiples cycles d'infection sur des cellules MT4 en présence d'une gamme croissante d'inhibiteurs. Le CellTiter-Glo est un test de viabilité cellulaire par luminescence. Le nombre de cellules viables en culture est basé sur la quantification de la présence d'ATP qui est un indicateur de cellules métaboliquement actives. L'ajout du réactif CellTiter-Glo résulte en une lyse cellulaire immédiate et à la génération d'un signal luminescent proportionnel à la quantité d'ATP présent directement corrélé au nombre de cellules présentes dans le milieu de culture. Les cellules MT4 (Human T cell leukaemia) couramment utilisées dans les tests d'infection au VIH-1 [439] ont la particularité d'être sensibles à la cytotoxicité induite par l'infection virale. Le test de viabilité cellulaire CellTiter-Glo sur des cellules MT4 permet donc de mesurer et de corrélérer de manière directe la mortalité cellulaire à la réplication efficace des virus testés. Contrairement aux cellules CEMX174 (Fusion product of human B cell line 721.174 and human T cell line CEM), les cellules MT4 sont sensibles à la cytotoxicité induite par la réplication du SIVmac 239. Cependant contrairement au VIH-1 dont les effets cytopathiques sont visibles dès 5 jours après l'infection, il faut attendre 7 jours pour le SIV. Nous avons donc réalisé des expériences en multiples cycles d'infection (multiple rounds : MR) car les virus VIH-1 NL4-3 et SIVmac 239 utilisés sont capables de se répliquer pendant les 5 à 7 jours suivants l'infection avant la lecture du test CellTiter-Glo. Dans le cadre d'expérimentations sur la réplication virale, le terme EC50 (half maximal effective concentration), définissant un pourcentage d'efficacité, est préféré à celui d'IC50 vu précédemment.

Le Raltegravir (RAL), inhibiteur catalytique de l'intégrase (INSTI), possède une activité similaire sur le SIV et le VIH-1 [405]. Il est donc utilisé comme contrôle positif dans ces tests de réplication virale. Les valeurs de CellTiter-Glo obtenues lors de l'infection avec le VIH-1 ou le SIV en présence de sa concentration maximale testée (2 μ M) sont utilisées pour établir le seuil de 100% de protection. L'ensemble des expériences réalisées en présence des

différents inhibiteurs étudiés précédemment ainsi que leurs EC50 sont répertoriées dans le tableau 3. Les pourcentages d'inhibition induits par les contrôles et les molécules les plus représentatives sont représentés dans la figure 34.

Comme attendu, le RAL inhibe efficacement à la fois de la réplication du VIH-1 mais également celle du SIV avec une EC50, de l'ordre du nM, comparable entre ces deux virus (figure 34A et tableau 3). Les molécules développées par Boehringer Ingelheim, BI-D et BI-224436 sont les moins actives sur la réplication du VIH-1, avec respectivement une EC50 de 300 et 80 nM. Dans ce test, les INLAIs les plus efficaces contre le VIH-1 ont une EC50 comprise entre 2 et 6 nM. C'est le cas pour la plupart des composés synthétisés par Mutabilis, mais également pour le SHG065 (Shionogi) (tableau 3). En corrélation avec les résultats obtenus *in vitro* sur l'interaction LEDGF-IN (tableau 2), l'ensemble des INLAIs utilisés sont donc capables d'inhiber la réplication du VIH-1 dans des cellules MT4 en multiples cycles d'infection avec un EC50 inférieure au μM .

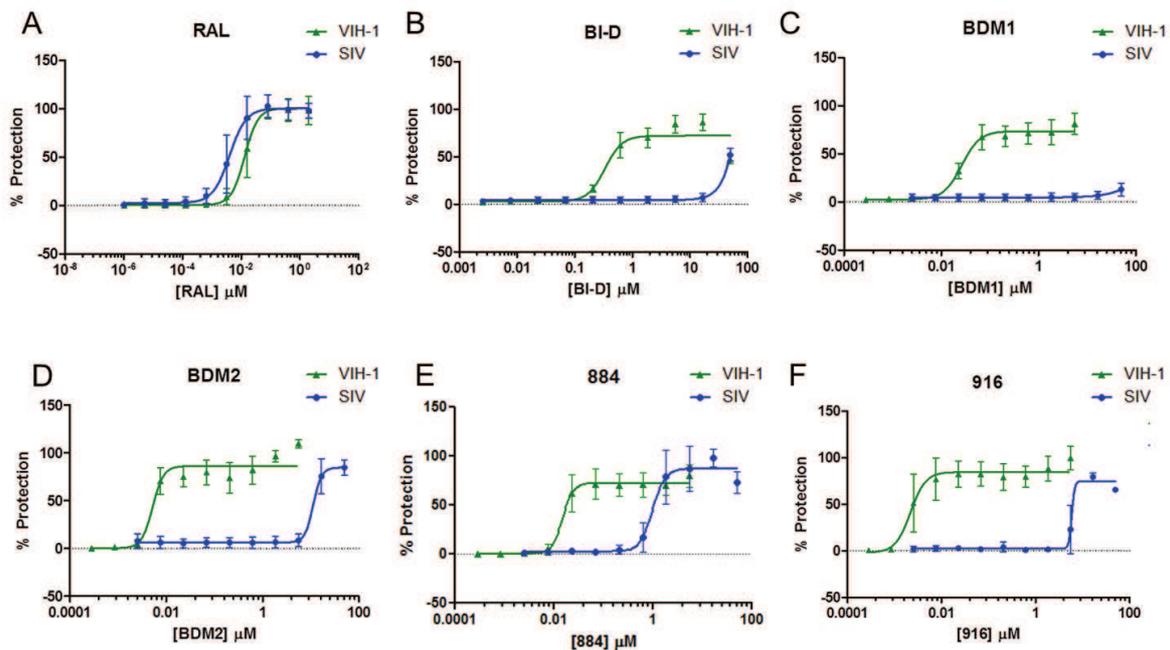


Figure 34: Réplication du VIH-1 et du SIV en multiples cycles d'infection en présence d'INLAIs.

Des cellules MT4 sont infectées avec une $\text{moi} = 6,25 \cdot 10^{-3}$ pour le VIH-1 et $\text{moi} = 10^{-2}$ pour le SIV en présence d'une gamme de dilutions de différents inhibiteurs. Un test CellTiter-Go mesurant la viabilité cellulaire est utilisé 5 ou 7 jours après l'infection au VIH-1 ou au SIV respectivement. Les pourcentages de protection, de la cytotoxicité associée à l'infection, induite par les composés RAL (A), BI-D (B), BDM1 (C), BDM2 (D), 884 (E) et 916 (F) sont représentés. L'ensemble de ces expérimentations a été réalisé en duplicats avec $n > 3$.

A la différence des effets observés sur la réplication du VIH-1, la molécule référence BI-D ne semble pas capable d'inhiber efficacement la réplication SIV dans des expérimentations de multiples cycles d'infection (figure 34B). Un écart important entre les EC50 sur le VIH-1 et le SIV est également visible, dans une moindre mesure, pour le BDM2 et le composé 916 (figures 34D et F). De la même manière, la majorité des INLAIs utilisés dans ce test présente un décalage de leur activité sur SIV avec des ratios EC50 SIV/VIH-1 compris entre 650 et 3000 (tableau 3). De plus des concentrations de BDM1 allant jusqu'à 50 µM ne permettent pas de protéger les cellules MT4 de la cytotoxicité induite par l'infection SIV (figure 34C). Des résultats similaires sont observés pour les composés 887, GS et SHG065 (tableau 3).

L'ensemble de ces résultats démontre que, contrairement à ce qui est observé pour le VIH-1, la plupart des INLAIs sont peu ou pas capables d'inhiber la réplication du SIV en MR dans des cellules MT4.

Tableau 3 : Activité de différents INLAIs la réplication en multiples cycles d'infection du VIH-1 et du SIV.

Les EC50 obtenues avec chacune des INLAIs sur le VIH-1 et le SIV, l'intervalle 95% de confiance de ces valeurs ainsi que leur rapport SIV/VIH-1 sont répertoriés dans cette table. Le ratio SIV/VIH-1 est normalisé avec les valeurs moyennes du plateau dans chaque condition.

nom du composé	EC50 VIH-1 (µM)	Intervalle 95% de confiance EC50 VIH-1 (µM)	EC50 SIV (µM)	Intervalle 95% de confiance EC50 SIV (µM)	Ratio SIV/VIH-1
BI-D	0,3	0,25 - 0,44	169	Ambigüe	706
BI-224436	0,08	0,054 - 0,11	56	Ambigüe	649
GS	0,04	0,030 - 0,046	x	x	x
SHG065	0,006	0,0046 - 0,0088	x	x	x
BDM1	0,03	0,021 - 0,032	x	x	x
BDM2	0,005	0,0038 - 0,0071	11	8,5 - 14,83	2 194
871	0,004	0,0029 - 0,0048	4	2,30 - 5,63	1 072
872	0,06	0,039 - 0,079	5	3,70 - 5,57	61
884	0,01	0,012 - 0,017	1	0,82 - 1,14	55
887	0,004	0,0034 - 0,0053	x	x	x
916	0,002	0,0016 - 0,0028	6	Ambigüe	3 050
RAL	0,01	0,011 - 0,014	0,004	0,0033 - 0,0046	0,3

L'INLAI identifiée dans notre étude comme étant la plus efficace pour inhiber la réplication SIV est la molécule 884 avec une EC50 égale à 1 µM (tableau 3). Bien que ces résultats soient corrélés avec ce qui a été observé *in vitro* (tableau 2), le décalage entre l'activité inhibitrice du composé 884 contre le VIH-1 et le SIV est plus important sur la réplication que sur l'interaction IN-LEDGF. Sur IN-LEDGF les IC50 pour VIH-1 et SIV sont toutes deux de l'ordre submicromolaire (respectivement 100 nM et 600 nM), alors qu'en MR sur des cellules MT4 le composé 884 montre une EC50 de 1 µM sur SIV contre 10 nM sur VIH-1 (figure 34E et tableau 3). Cette différence d'activité de la molécule 884 est caractérisée par les variations de ratio SIV/VIH-1 de 4 sur l'interaction IN-LEDGF contre 55 sur la réplication (tableaux 2 et 3).

La molécule 884 inhibe donc l'interaction *in vitro* de LEDGF-IN VIH-1 ou SIV avec une efficacité comparable, cependant son activité sur la réplication virale est limitée car environ 50 fois moins importante sur le SIV que sur le VIH-1.

C - L'efficacité limitée des INLAIs sur la production et l'infectivité de virions SIV

Sachant que l'inhibition des étapes tardives de la réplication du VIH-1 par les INLAIs conduit à une production de virions défectueux en infectivité [344], nous avons ensuite testé l'activité des INLAIs sur l'infectivité des virions VIH-1 et du SIV. Pour cela nous avons produit des virions en présence de différents inhibiteurs puis testé leur infectivité par CellTiter-Glo dans des expérimentations en multiples cycles d'infection (MR) de cellules MT4 comme décrit précédemment.

Tous les antirétroviraux dont nous disposons étant resuspendus dans du DMSO suite à leur synthèse chimique, la production des stocks de virus sauvages VIH-1 et SIV est réalisée en présence de DMSO afin de se placer dans les mêmes conditions de production virale que lors de l'ajout d'INLAIs. Les particules virales VIH-1 ont été produites en présence d'un des composés les plus actifs synthétisés par Mutabilis, le BDM2. Les virions SIV ont, quant à eux, été produits en présence de la molécule 884 sélectionnée dans les expériences précédentes comme la plus active contre le virus simien.

Des cellules MT4 ont été infectées avec une gamme croissante de ces différentes productions virales et l'infectivité de ces virions est étudiée par un test de CellTiter-Glo. Le

pourcentage de viabilité cellulaire est rapporté aux valeurs obtenues pour des cellules non infectées en présence de Triclosan qui est une molécule connue pour induire un effet cytopathique. La quantification de virus infectieux est rapportée en TCID50 (50% Tissue Culture Infective Doses) car cela représente la concentration d'agent pathogène nécessaire pour induire 50% d'effet cytopathique sur des tissus ou des cellules cibles.

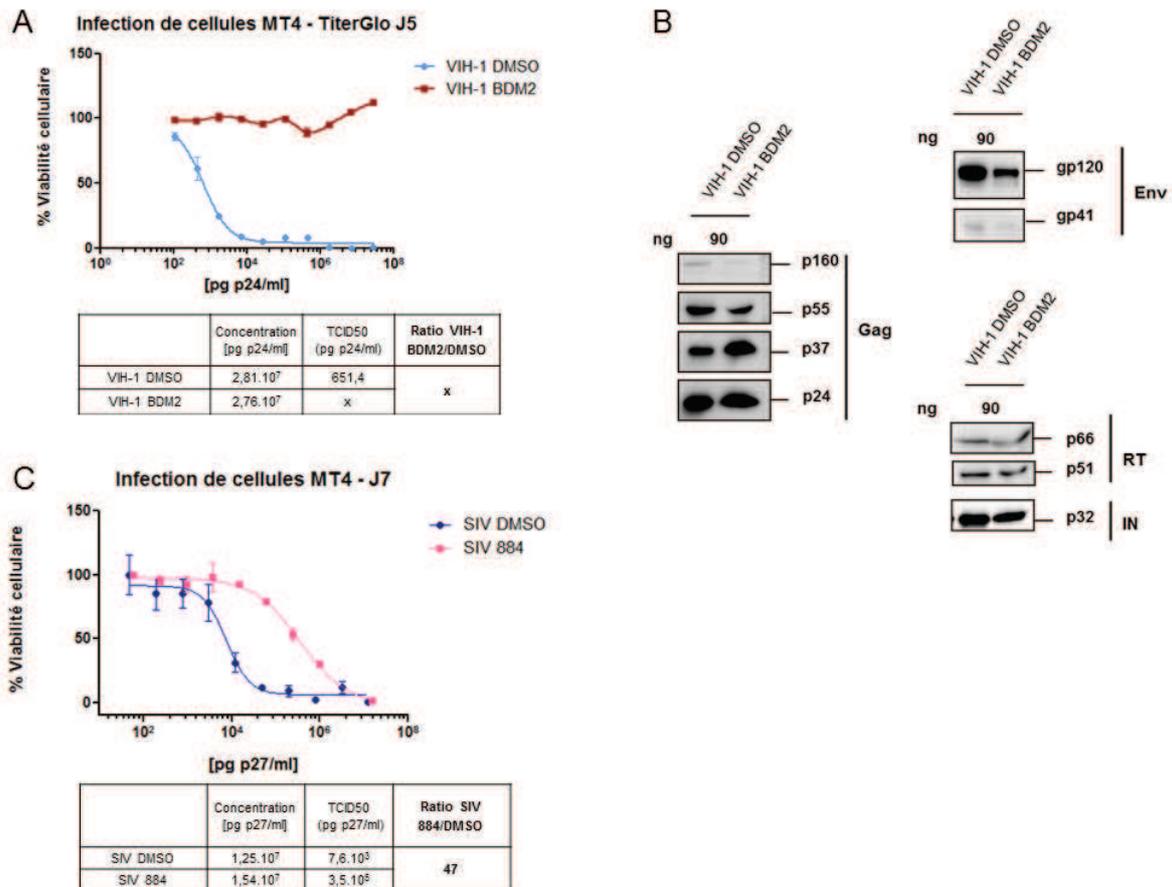


Figure 35 : Infectivité de virions VIH-1 ou SIV produits en présence d'INLAIs.

Des particules virales VIH-1 ou SIV ont été produites dans des cellules 293T. (A) Des cellules MT4 ont été infectées avec des dilutions sérielles de VIH-1 produit en présence de BDM2, puis un test CellTiter-Glo a été réalisé cinq jours suivant l'infection. L'intégrité de la maturation protéique de ces virions a été vérifiée par western blot (B). Des virions SIV ont été produits selon le même protocole mais en présence de la molécule 884 et le test CellTiter-Glo a été réalisé sept jours après l'infection (D). Le DMSO est utilisé comme contrôle négatif pour l'ensemble des productions de stocks sauvages. Sous chaque graphique, la concentration initiale des stocks VIH-1 et SIV produits est indiquée. Les TCID50 obtenues dans les expérimentations en MR ainsi que le rapport stock inactivé/sauvage pour chaque condition sont également indiquées. Les expérimentations de CellTiter-Glo ont été réalisées avec $n > 3$.

Contrairement au VIH-1 produit en présence de DMSO qui induit un fort effet cytopathique sur les cellules MT4 avec une TCID50 de 650 pg/ml, lors de l'infection avec des virions produits en présence de BDM2 aucun effet cytopathique n'est décelé après cinq jours d'infection (figure 35A).

Nous avons vérifié par western blot que la présence du composé BDM2 lors de la production de virions VIH-1 ne modifie pas l'intégrité de la maturation protéique des virions ainsi néoformés (figure 35B). De plus, les concentrations des stocks viraux produits en présence d'INLAIs ont été dosées par un test Elisa reconnaissant l'antigène CAp24 pour le VIH-1 ou CAp27 pour le SIV. La concentration des productions virales VIH-1 et SIV est équivalente que celles-ci soient réalisées en présence de DMSO ou de différents INLAIs (figures 35A et C). Cela démontre que la présence d'INLAIs dans les cellules productrices n'influence pas l'efficacité de la production virale, estimée en CAp24 ou CAp27 de virions VIH-1 ou SIV respectivement, dans des cellules 293T.

Pour rappel, les cellules MT4 étant plus sensibles à la cytotoxicité induite par l'infection au VIH-1 que par le SIV, la mortalité cellulaire est visible dès cinq jours suivant l'infection au VIH-1, alors que sept jours sont nécessaires pour que cela soit visible pour le SIV (figures 35A et C). Les virions SIV produits en présence de la molécule 884 sont environ 50 fois moins infectieux que les virus sauvages produits en présence de DMSO (figure 35C). Lorsqu'elle est ajoutée dans les cellules productrices, la molécule 884 synthétisée par Mutabilis possède donc une activité inhibitrice sur la réplication du SIV et sur l'infectivité des virions néoformés. Le BDM2 d'une part et le composé 884 d'autre part ont été sélectionnés parmi les molécules les plus efficaces contre le VIH-1 et le SIV respectivement. Cependant le décalage de TCID50 entre les virions produits ou non en présence d'INLAIs est seulement de 50 fois pour le SIV, alors qu'en 5 jours l'infectivité de virions VIH-1 produits en présence de BDM2 est indétectable. (figures 35A et C).

En corrélation avec les résultats précédents, l'INLAI 884 sélectionnée comme la plus efficace pour inhiber l'interaction LEDGF-IN SIV *in vitro* n'est donc pas capable d'inhiber la réplication et l'infectivité des virions SIV avec la même efficacité que ce qui est observé avec le BDM2 pour le VIH-1. Dans la suite de cette étude, nous avons donc cherché à déterminer quelle pourrait être la cause de l'efficacité limitée des INLAIs sur la réplication du SIV contrairement à ce qui est observé pour le VIH-1.

D - Les INLAIs n'induisent pas la multimérisation IN SIV *in vitro*

Les INLAIs sont des inhibiteurs allostériques car en plus de l'inhibition de l'interaction LEDGF-IN, elles sont également capables d'induire une multimérisation non fonctionnelle de l'IN [341,345,352,360]. Les INLAIs inhibant l'interaction LEDGF-IN SIV avec une efficacité similaire que ce qui est observé pour le VIH-1, nous avons donc cherché à savoir si leur faible efficacité sur la réplication du virus simien pouvait être associée à un défaut de leur capacité à induire la multimérisation de l'IN SIV.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une PCR de la séquence codante de l'IN SIVmac 239 à partir de la construction de P. Cherepanov [437] avec des amorces contenant une séquence Flag afin de la cloner dans un nouveau plasmide pGEX. La construction résultante de ce clonage (figure 36A) code pour une protéine de fusion GST-IN-Flag SIV (avec la marque GST en N-ter et le Flag en C-ter). Cette protéine de fusion a été produite par transformation de bactéries puis purification par chromatographie d'affinité en présence d'une protéase PreScission afin de s'affranchir de la marque GST et ne conserver que la protéine recombinante d'intérêt IN-Flag SIV (figure 36B). Une protéine recombinante IN VIH-1 marquée Flag en N-terminal (Flag-IN VIH-1) produite à Mutabilis est utilisée afin de faire de nouveau le parallèle VIH-1/SIV dans l'ensemble des expérimentations suivantes. Afin d'étudier la multimérisation IN-IN *in vitro* par HTRF il est nécessaire de disposer de deux types de marques pouvant être reconnues par les anticorps donneurs et accepteurs, ainsi nous utilisons les protéines IN-His SIV et His-IN VIH-1 décrites précédemment.

Brièvement, le principe du test HTRF utilisé pour étudier la multimérisation IN-IN et basé sur ce qui a été décrit précédemment. Les protéines d'intérêt sont reconnues par des anticorps couplés à des fluorophores donneur/accepteur qui, s'ils sont assez proches, permettent un transfert de fluorescence pouvant être mesuré. Cette fois-ci les protéines interagissant sont toutes des IN, nous utilisons donc des anticorps HTFR anti-His et anti-Flag afin de reconnaître les protéines His-IN et Flag-IN pour le VIH-1 d'une part et les protéines IN-His et Flag-IN pour le SIV d'autre part. *In vitro*, l'intégrase libre du VIH-1 existe sous plusieurs formes : monomères, dimères et agrégats [293]. Dans ce test HTRF les IN-Flag et IN-His sont mises en contact et, comme elles conservent cette capacité d'oligomérisation, une interaction basale IN-IN est observée. Celle-ci définit le 0% de multimérisation. Les INLAIs étant capables d'induire une multimérisation aberrante non fonctionnelle de l'intégrase, la présence d'une dose croissante de ces molécules augmente fortement l'interaction IN-IN basale et donc le pourcentage de multimérisation. Le protocole HTRF utilisé pour l'étude de la multimérisation IN-IN *in vitro* est schématisé dans la figure 36C.

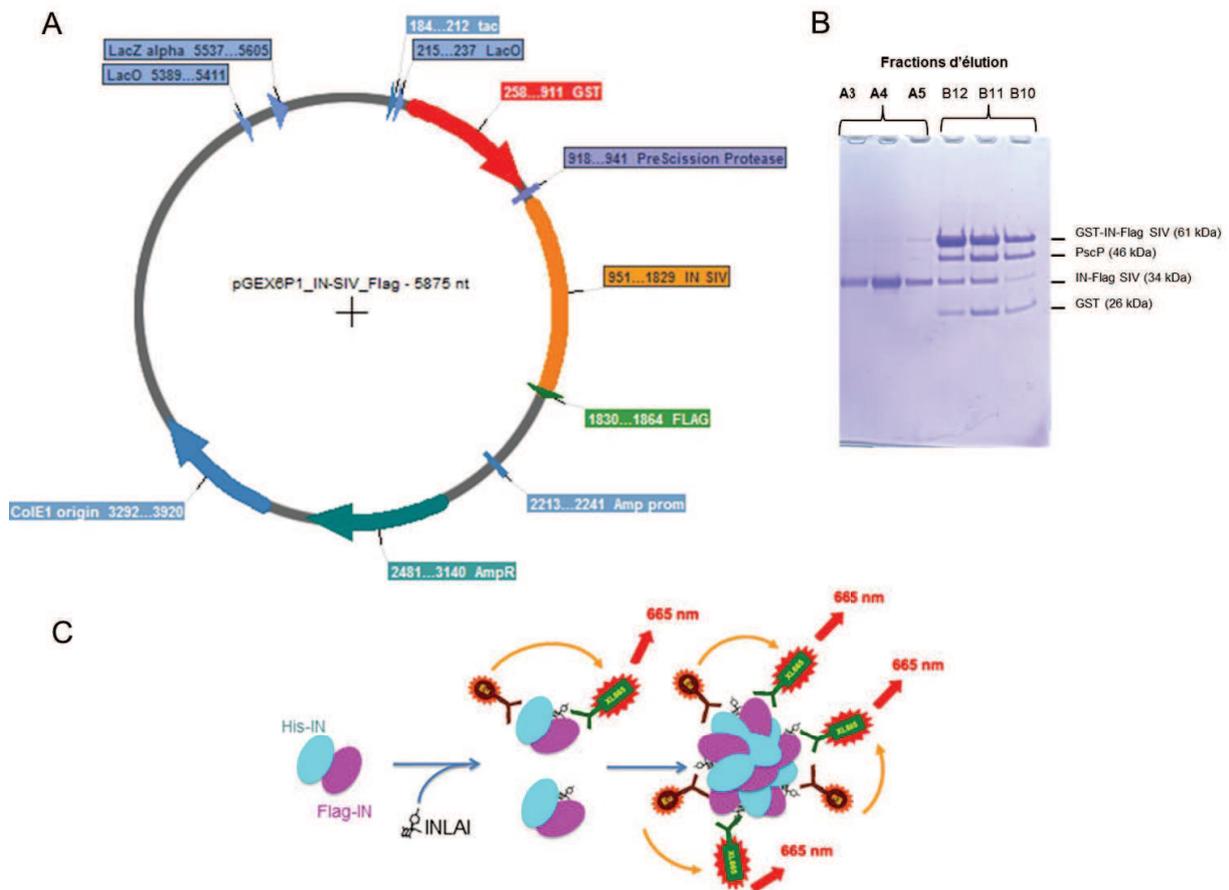


Figure 36 : Production de protéine IN-Flag SIV et principe du test de multimérisation IN-IN *in vitro*.

(A) Un plasmide codant pour la protéine IN du SIVmac 239 marquée GST en N-terminal et Flag en C-terminal a été cloné pour (B) la production après clivage par la protéase PreScission de la protéine recombinante IN-Flag SIV. Les fractions A3 à A4 sont celles où la protéine d'intérêt a été éluée. (C) Schéma du principe du test HTRF utilisé pour étudier la multimérisation IN-IN *in vitro*.

Nous avons déterminé les conditions optimales pour ce test HTRF IN-IN. Comme précédemment, la reconnaissance spécifique de la marque Flag de la protéine recombinante IN-Flag SIV a été vérifiée par compétition avec la protéine His-GST-Flag (figure 37A). L'IC₅₀ de la protéine IN-Flag SIV pour inhiber la reconnaissance de la protéine multi-épissée est de 18 nM, ce qui signifie qu'elle est reconnue par l'anticorps anti-Flag avec une efficacité similaire à la reconnaissance de la protéine His-IN VIH-1 par l'Ac anti-His vu précédemment (figure 31A, EC₅₀ = 13 nM). Il est intéressant de noter que l'IC₅₀ de la protéine IN-His SIV

était un peu plus élevée (figure 31A, EC50 = 53 nM) ce qui suggère que la protéine IN-Flag SIV est plus efficacement reconnue que son homologue IN-His SIV dans notre test HTRF.

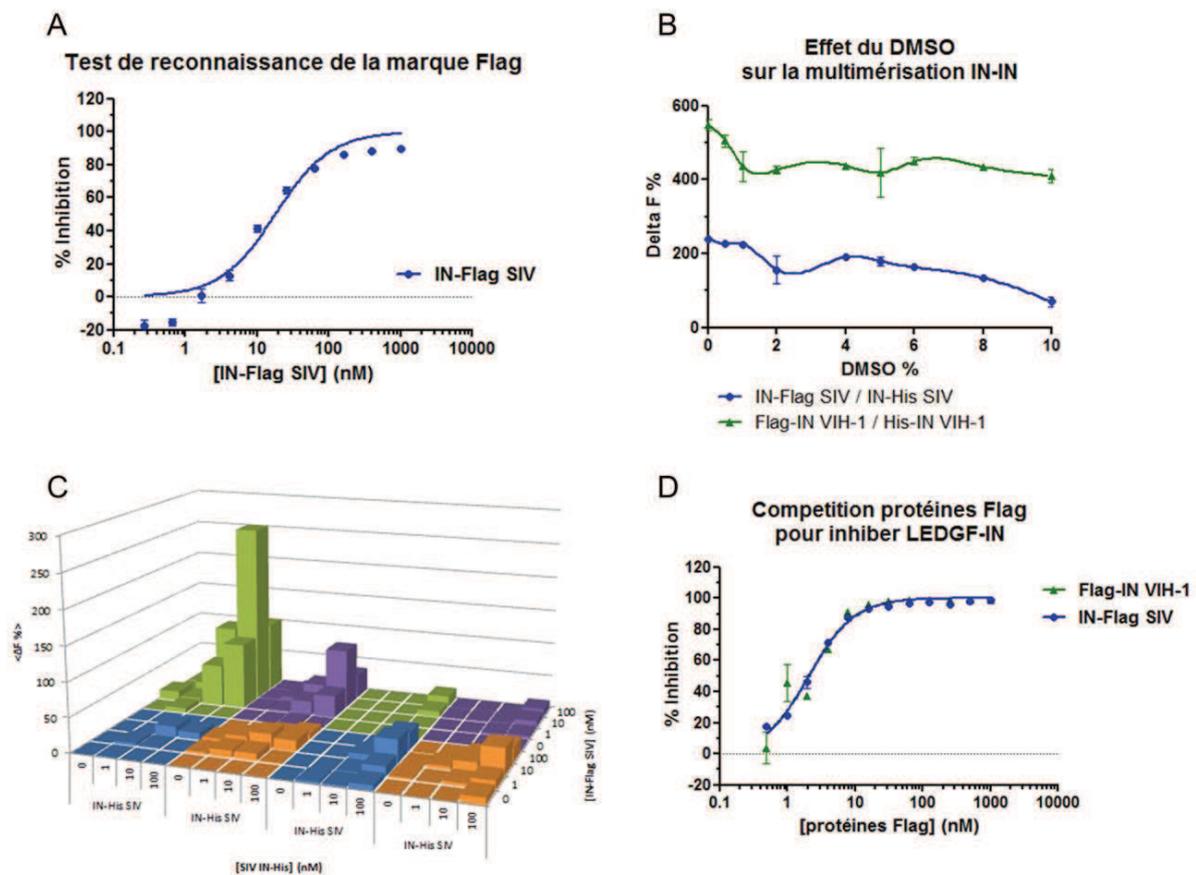


Figure 37 : Mise au point des expérimentations HTRF afin d'étudier la multimérisation IN-IN VIH-1 ou SIV *in vitro*.

(A) Capacité de la protéine recombinante marquée IN-Flag SIV d'inhiber la reconnaissance de la protéine multi-marquée His-GST-Flag par les anticorps HTRF anti-Flag. (B) Effet de la présence dans le tampon HTRF d'une gamme croissant de DMSO sur l'interaction entre les sous unités IN-IN VIH-1 ou SIV. (C) Effet de la présence d'une gamme croisée de 1 à 100 nM de chaque partenaire sur la multimérisation IN-IN SIV. Les différents couples d'anticorps testés dans ces conditions sont indiqués dans la figure 3C en remplaçant Ac GST par Ac Flag. (D) L'inhibition de l'interaction LEDGF-IN en présence d'une gamme croissante de protéines IN marquées Flag non reconnue.

L'effet de la présence de DMSO a également été testé sur la multimérisation IN-IN VIH-1 ou SIV (figure 37B). Pour cela les conditions optimisées pour le test HTRF IN-IN VIH-1 par l'équipe travaillant à Mutabilis ont été utilisées en présence de doses croissantes de DMSO. Les résultats obtenus montrent que l'ajout de DMSO n'influe pas de manière drastique le signal HTRF. Ainsi nous avons choisi de nous placer comme précédemment à une

concentration finale de DMSO à 2,5% dans la suite de nos expérimentations. Le signal HTRF des expérimentations de multimérisation IN-IN est plus faible que celui de l'interaction LEDGF-IN avec respectivement des $\Delta F = 500$ et $3\ 000$ pour VIH-1 et 200 et 500 pour SIV (figure 31B et 37B). De nouveau un test de gammes croisées a été utilisé selon le même plan de plaque que précédemment en remplaçant les anticorps anti-GST par des anti-Flag (figure 32C) afin de déterminer les conditions optimales du test HTRF IN-IN SIV. Le couple d'Ac Flag-K/His-d2 est celui qui donne le signal le plus fort en présence de $100\ \text{nM}$ de IN-His SIV et $10\ \text{nM}$ de IN-Flag SIV (figure 37C). La nécessité d'avoir dix fois plus de IN-His s'explique peut-être par le fait qu'elle soit moins bien reconnue que IN-Flag SIV par les Ac.

Enfin une expérience de compétition permettant de tester la capacité des protéines Flag-IN VIH-1 ou IN-Flag SIV à inhiber respectivement les interactions LEDGF avec His-IN VIH-1 ou IN-His SIV a été réalisée. Les conditions HTRF LEDGF-IN utilisées sont celles mises au point dans la partie A avec les anticorps anti-GST et anti-His. L'excès de protéine IN marquée Flag si elle est capable d'interagir avec l'un ou l'autre des partenaires reconnus permet d'inhiber l'interaction entre LEDGF-IN. Les IC_{50} des protéines Flag-IN VIH-1 ou IN-Flag SIV pour inhiber leur interaction LEDGF-IN respectives sont équivalentes (figure 37D). Ces résultats ne permettent pas de statuer à proprement dit sur la spécificité des protéines Flag-IN VIH-1 ou IN-Flag SIV mais indiquent que leur capacité d'interagir avec His-IN VIH-1 ou IN-His SIV est équivalente ainsi nous pourrions comparer les résultats VIH-1/SIV obtenus.

Ainsi nous avons mis au point un test HTRF qui permet d'étudier la multimérisation IN-IN VIH-1 ou SIV dépendante des INLAIs. En effet en présence d'une gamme croissante d'INLAIs effectrices, le pourcentage de multimérisation des protéines IN marquées Flag et His se retrouvera donc augmenté. L'ensemble des INLAIs étudiés induit très efficacement la multimérisation de l'IN du VIH-1, avec des AC_{50} de l'ordre du nM. Les plus actives d'entre elles, dont la majorité des molécules synthétisées par Mutabilis, possèdent une AC_{50} (concentration nécessaire pour induire 50% d'activation) inférieure à $10\ \text{nM}$ (tableau 4).

Les résultats précédents ont montré que les INLAIs synthétisés par Mutabilis les plus efficaces inhibent l'interaction de LEDGF-IN VIH-1 avec une EC_{50} comprise entre $30\text{-}50\ \text{nM}$ (tableau 2). Cependant comme décrit dans la littérature, l'ensemble des INLAIs ont une plus forte efficacité pour induire une multimérisation IN-IN du VIH-1. En effet dans l'étude *in vitro* de cette oligomérisation, les molécules les plus actives affichent une AC_{50} inférieure à $10\ \text{nM}$ (tableau 4). Ces résultats confortent le fait que les molécules synthétisées par Mutabilis, comme l'ensemble des INLAIs, possèdent une capacité à induire une multimérisation aberrante IN VIH-1 plus forte que leur activité d'inhibition IN-LEDGF pour laquelle elles ont été initialement développées.

Tableau 4 : Activité de différents INLAIs sur la multimérisation *in vitro* IN-IN du VIH-1 et du SIV.

Les AC50 obtenues sur le VIH-1, les intervalles de 95% de confiance de ces valeurs ainsi que le plateau de multimérisation IN-IN pour chaque composé sont répertoriées.

nom du composé	AC50 VIH-1 (nM)	Intervalle 95% de confiance AC50 VIH-1 (nM)	Plateau (% multimérisation)
BI-D	14	8,58 - 22,84	168
BI-224436	7	4,55 - 10,58	356
GS	12	9,27 - 16,02	422
SHG065	15	7,69 - 30,67	250
BDM1	27	18,43 - 38,31	281
BDM2	9	6,52 - 12,21	415
871	8	4,80 - 14,18	444
872	7	4,01 - 11,94	340
884	9	6,82 - 13,03	378
887	13	9,27 - 17,30	362
916	8	5,53 - 11,66	342

Au contraire, aucun inhibiteur utilisé dans cette étude ne semble capable d'induire 100% de multimérisation des protéines IN du SIV, y compris lorsque des gammes allant jusqu'à la centaine de μM sont utilisées (figures 38A à E). Les valeurs des AC50 pour IN-IN SIV ne sont pas montrées car, aucune molécule n'atteignant 50% d'activation réelle (comprise entre 100 et 250 pour le VIH-1), celles-ci ne sont pas significatives. En effet des gammes d'INLAIs jusqu'à 300 μM ont été utilisées pour étudier l'effet des INLAIs sur la multimérisation IN-IN du SIV, mais la plupart des composés testés n'induisent pas de multimérisation IN-IN comme c'est le cas pour le BI-D, le BDM1 et le BDM2 (figures 38A à C). Cela signifie que l'interaction IN-IN observée correspond au niveau basal d'oligomérisation de la protéine et que la présence de ces composés n'a donc aucun effet sur celle-ci. Néanmoins, certaines molécules semblent avoir une faible activité sur la multimérisation de l'IN SIV lorsqu'elles sont ajoutées à de fortes concentrations. En effet, lorsque les composés 884 et 916 sont utilisés à 300 μM , une augmentation de 200 % de multimérisation est observée (figures 38D

et E). Les valeurs maximales atteintes sur l'interaction IN-IN du VIH-1 avec ces molécules étant d'environ 350% (tableau 4), leur AC50 pour le SIV doit probablement être supérieure à 100 μM . Sachant que les INLAIs 884 et 916 ont une AC50 sur VIH-1 inférieure à 10 nM, le ratio AC50 SIV/VIH-1 semble donc être supérieur à 10 000. Ces observations suggèrent que les INLAIs les plus actives contre SIV ont un effet sur la multimérisation IN-IN SIV environ 10 000 fois moins efficace que sur IN-IN VIH-1.

Il est important de noter que l'effet des INLAIs sur la multimérisation IN-IN du SIV, lorsqu'il est visible, n'est observable qu'à la concentration maximale testée et n'atteint pas de plateau (figure 38). Afin d'avoir des données significatives, il serait donc nécessaire d'ajouter à ce test un contrôle positif de l'oligomérisation IN-IN SIV.

L'ensemble de ces résultats suggère que certaines INLAIs sont capables d'inhiber l'interaction de LEDGF avec l'IN du SIV avec une efficacité similaire à celle observée sur le VIH-1. Au contraire leur capacité à induire une multimérisation non fonctionnelle de l'IN du VIH-1, qui est leur activité la plus efficace, ne semble pas conservée contre l'IN du SIV.

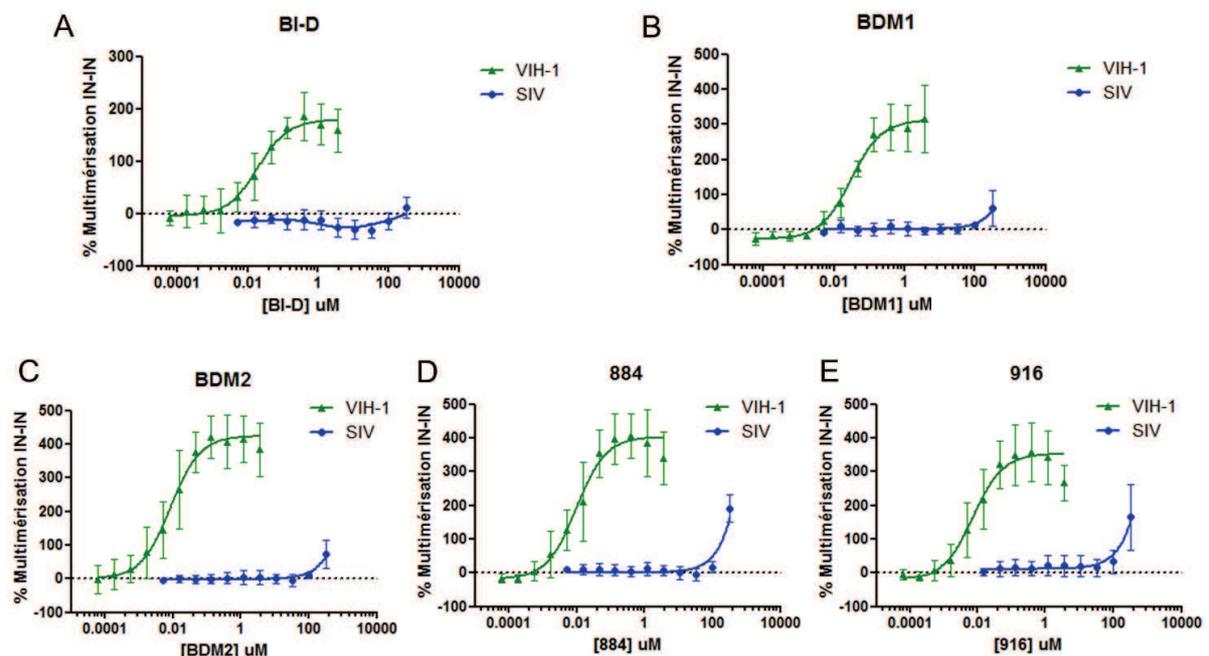


Figure 38 : Multimérisation *in vitro* de l'IN du VIH-1 ou du SIV en présence d'INLAIs.

Un test HTRF avec des protéines recombinantes marquées His et Flag pour le VIH-1 ou le SIV est utilisé. Le pourcentage d'augmentation de l'interaction IN-IN du VIH-1 ou du SIV induite par les composés BI-D (A), BDM1 (B), BDM2 (C), 884 (D) et 916 (E) sont représentés.

E - Les INLAIs inhibent les étapes précoces de la réplication SIV

Afin de tester l'efficacité des INLAIs synthétisés par Mutabilis sur les étapes précoces de la réplication du VIH-1 et du SIV, nous avons réalisé des expériences en cycle unique (single round : SR) d'infection dans des cellules TZM-bl. Ces cellules ont la particularité de comporter un gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'un promoteur viral. Dans notre étude, ces cellules TZM-bl sont donc infectées par VIH-1 ou SIV en présence de gammes de concentrations de différents INLAIs. Ainsi dans cet essai le dosage de la luciférase, dont l'expression est corrélée à l'activation du promoteur viral, est directement associé à l'infection. Les virus utilisés étant capables de se répliquer, le dosage de la luciférase est effectué 24h après l'infection afin de réaliser des expérimentations en cycle unique d'infection. Cela permet d'observer uniquement l'effet des INLAIs sur les étapes précoces de la réplication du VIH-1 et du SIV.

Comme pour l'étude de la réplication virale dans les cellules MT4 (figure 34), le RAL est utilisé comme contrôle positif car il inhibe efficacement l'étape d'intégration à la fois du VIH-1 et du SIV. Les valeurs de luciférase obtenues lors de l'infection avec le VIH-1 ou le SIV en présence de 2 μM de RAL correspondent au 100% de protection. Comme attendu, le RAL inhibe très efficacement les étapes précoces de la réplication du VIH-1 (figure 39A). Au contraire, des gammes allant jusqu'à 50 μM de BI-D, BDM1 ou 884 doivent être utilisées pour observer 100% de protection (figures 39B et C). Les EC50 contre le VIH-1 pour chacun de ces composés sont respectivement de 15, 11 et 8 μM dans ces expérimentations en SR sur des TZM-bl (tableau 5), alors qu'elles sont de 300, 30 et 10 nM lors d'infections en MR sur des cellules MT4 (tableau 3). Comme cela a déjà été observé, les INLAIs sont donc moins efficaces pour inhiber les étapes précoces que les étapes tardives de la réplication du VIH-1.

En accord avec les résultats précédents, le BI-D et le BDM1 sont peu ou pas capables d'inhiber la réplication du SIV. Ce défaut d'inhibition est confirmé sur les étapes précoces du cycle viral car ces molécules affichent des EC50 proches ou supérieures au millimolaire (mM) dans les expérimentations en SR (tableau 5). Au contraire, la présence du composé 884 protège les cellules TZM-bl de l'infection en SR par le SIV (figure 39D). Avec une EC50 de 29 μM , son efficacité est du même ordre que celle contre le VIH-1 (tableau 5).

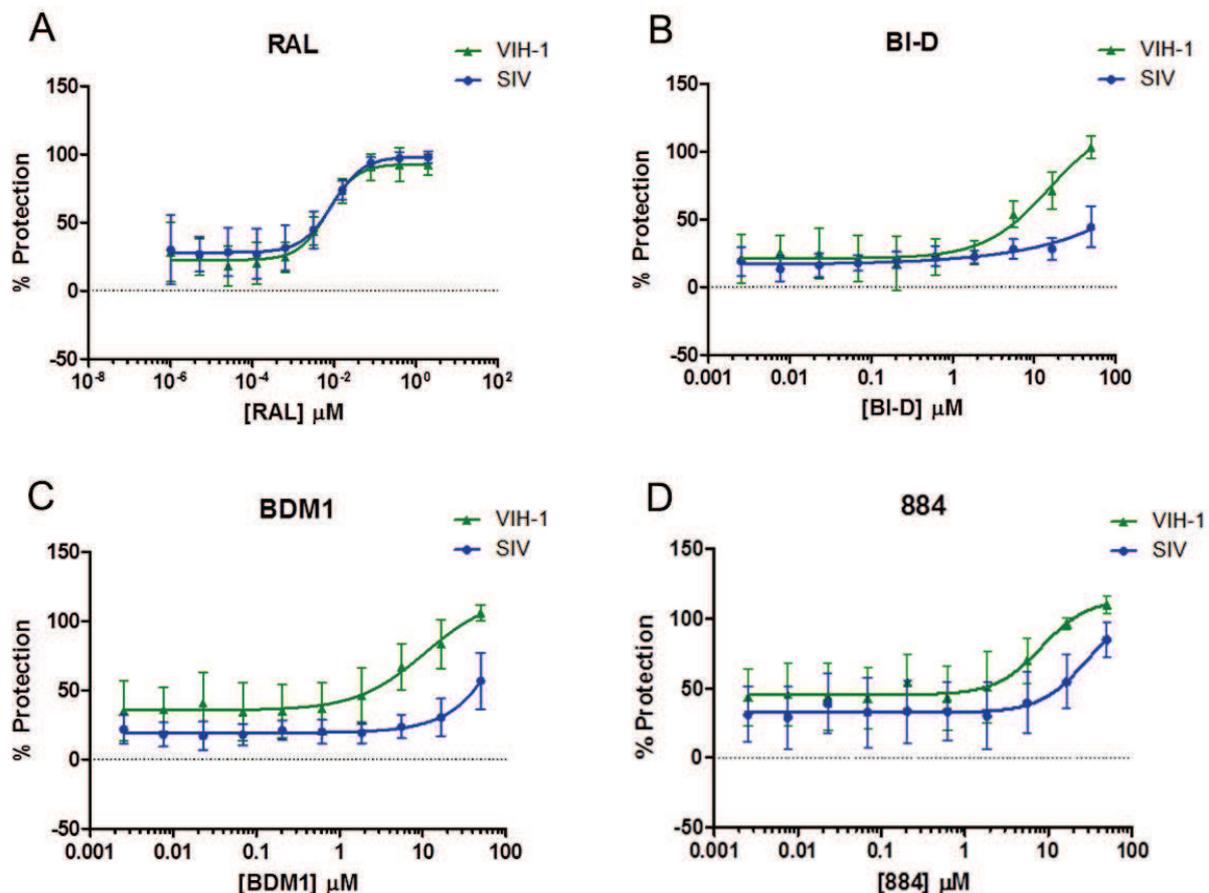


Figure 39 : Réplication du VIH-1 et du SIV en cycle unique d'infection en présence d'INLAIs.

Des cellules TZM-bl sont infectées avec une moi = 10^{-1} pour le VIH-1 et le SIV en présence d'une gamme de dilutions de différents inhibiteurs. Les TZM-bl possédant un gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'un promoteur viral, un dosage luciférase est réalisé 24h après l'infection. Les pourcentages de protection à l'infection induits par les composés RAL (A), BI-D (B), BDM1 (C) et 884 (E) sont représentés. L'ensemble de ces expérimentations a été réalisé en duplicats avec $n > 3$.

L'ensemble de ces résultats montre que le composé 884 est capable d'inhiber l'interaction IN-LEDGF ainsi que d'inhiber les étapes précoces de la réplication du SIV avec une efficacité similaire à ce qui est observé contre le VH-1. Cependant cette molécule semble avoir une activité limitée sur l'induction de la multimérisation non fonctionnelle de l'IN ainsi que l'inhibition de l'infection en multiples cycles du SIV.

Tableau 5 : Activité de différents inhibiteurs de l'IN sur les étapes précoces de la réplication du VIH-1 et du SIV.

Le nombre d'expérimentations réalisées en duplicats, les EC50 obtenues avec chacune des INLAIs sur le VIH-1 et le SIV ainsi que leur rapport SIV/VIH-1 sont répertoriés dans cette table. Le ratio SIV/VIH-1 est normalisé avec les valeurs moyennes du plateau dans chaque condition.

nom du composé	EC50 VIH-1 (µM)	Intervalle 95% de confiance EC50 VIH-1 (µM)	EC50 SIV (µM)	Intervalle 95% de confiance EC50 SIV (µM)	Ratio SIV/VIH-1
BI-D	15	5,57 - 42,31	1.10'	Ambigüe	x
BDM1	11	3,15 - 35,67	920	Ambigüe	181
884	8	4,67 - 14,78	29	1,97 - 410,7	4
RAL	0,007	0,0048 - 0,0098	0,009	0,0061 - 0,013	1

F - Les virus SIV mutants pour IN au niveau du site d'interaction avec LEDGF présentent un défaut d'infectivité

Dans le but de restaurer le phénotype antiviral des INLAIs contre le VIH-1 sur le SIV. Nous avons généré des virus SIV comportant plusieurs mutations sur l'IN afin de les humaniser. Au regard de l'alignement de séquences de l'intégrase du VIH-1 et du SIV, des différences ont pu être observées, notamment au niveau du site d'interaction avec LEDGF, ce qui nous a permis de sélectionner les mutations qui pourraient être impliquées dans la diminution de l'efficacité des INLAIs contre le SIV.

En collaboration avec le laboratoire de Marc Ruff, trois constructions de mutations « humanisantes » ont été sélectionnées sur l'IN: R95Q/ E125T, M128A et S171H/ E173K. Les différents virus SIV mutants produits à ce jour sont répertoriés dans la tableau 6. Le virus mutant comportant l'ensemble des modifications (SIV IN 5 mut) a été produit par le biais d'un gène synthétique, les doubles mutants (SIV mut1 et mut4) par mutagenèse dirigée.

Les productions virales de ces différents virus ont été réalisées comme décrit précédemment dans des cellules 293T et l'intégrité de la maturation protéique des virions ainsi produits a été vérifiée par western blot (figure 40A). En effet aucune différence notable n'est visible entre les protéines virales des virus SIV WT ou SIV IN 5 mut aussi bien dans les cellules productrices que dans les virions eux-mêmes. De plus, la concentration des productions de

virus mutants sont comprises entre $6,6$ et $7,2 \cdot 10^6$ pg p27/ml contre $10 \cdot 10^6$ pour le virus sauvage (tableau 6). Cela démontre que l'introduction d'une ou plusieurs de ces mutations ne semble pas modifier de manière drastique l'efficacité de la production virale.

Tableau 6 : Titres et concentrations de différents virus SIV mutants de l'IN.

	mutations					[pg p27/ml]	Titre BGal (UI/ml)
SIV WT	x	x	x	x	x	10 000 000	1 415 500
SIV IN 5 mut	R95Q	E125T	M128A	S171H	E173K	6 600 000	380
SIV mut1	x	x	x	S171H	E173K	8 130 000	23 800
SIV mut4	R95Q	E125T	x	x	x	7 160 000	25 000

Des cellules TZM-bl ont été infectées avec des dilutions sérielles de chacune de ces productions virales. Ces cellules possédant également un gène β Gal (β -Galactosidase) sous le contrôle d'un promoteur lentiviral, un titre en unités infectieuses (UI)/ml a pu être calculé après l'ajout de X-gal. A l'inverse de la concentration virale, le titre infectieux des productions de virus SIV mutants semble lourdement impacté par l'ajout de plusieurs mutations « humanisantes » (tableau 6). Ce phénomène est d'autant plus marqué pour le virus porteur des cinq mutations SIV IN 5 mut qui est près de 4 000 fois moins infectieux que le SIV sauvage.

Des expériences préliminaires ont été réalisées afin de tester l'infectivité du SIV IN 5 mut sur les étapes précoces et tardives de la réplication, en comparaison au SIV sauvage. Pour cela, des cellules TZM-bl ont été infectées avec des dilutions sérielles de ces deux types de production virale et un dosage luciférase a été réalisé 24 heures après l'infection afin d'étudier la réplication virale en cycle unique d'infection. Le SIV sauvage est capable d'activer efficacement le promoteur viral de ces cellules. Au contraire le SIV IN 5 mut n'induit pas l'activation du gène luciférase, y compris à des concentrations supérieures à 10^5 pg p27/ml (figure 40B). L'insertion de ces cinq mutations simultanées sur l'IN du SIV provoque un défaut lors des étapes précoces de l'infection. Afin d'évaluer la capacité de réplication du SIV IN 5 mut en multiples cycles d'infection, une expérimentation de CellTiter-Glo sur des cellules MT4 a de nouveau été réalisée. En corrélation avec les résultats obtenus sur les étapes précoces, la présence du SIV IN 5 mut n'induit aucun effet cytopathique visible sur

des cellules MT4 après sept jours d'infection, contrairement à ce qui est observé pour le SIV WT (figure 40C). Le virus SIV IN 5 mut semble donc être non infectieux.

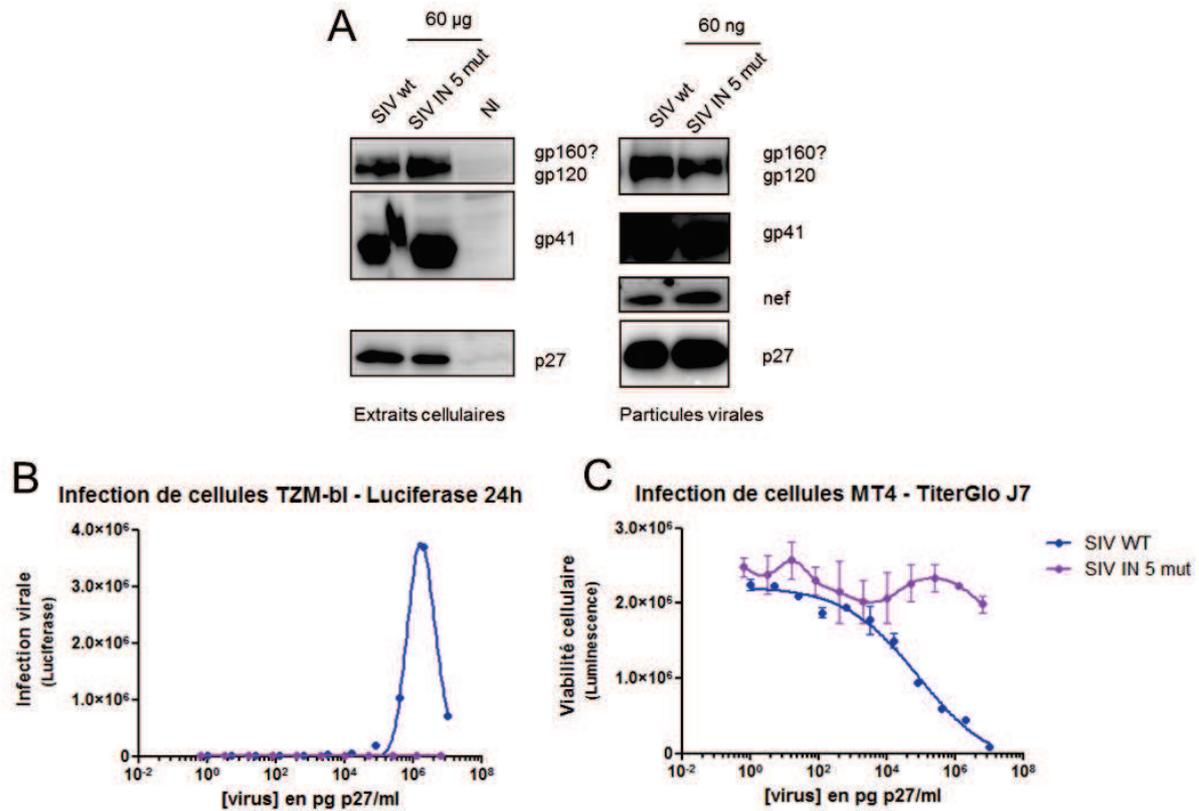


Figure 40 : Caractérisation de la production de SIV porteur de 5 mutations de l'IN.

En parallèle de virus sauvages, des particules virales de SIV contenant 5 mutations de l'IN (R95Q, E125T, M128A, S171H et E173K) ont été produites dans des cellules 293T. La maturation protéique de ces virions a été observée par western blot (A). Des cellules TZM-bl (B) et MT4 (C) ont été infectées avec des dilutions sérielles de ces productions virales, puis un dosage luciférase et un test CellTiter-Glo ont été réalisés respectivement 24h ou sept jours après l'infection.

L'ensemble de ces résultats montre que la substitution simultanée des acides aminés R95Q, E125T, M128A, S171H et E173K sur l'IN du SIV le rendent non infectieux. Les doubles mutants R95Q/E125T (SIV mut1) et S171H/E173K (SIV mut4) semblent avoir un phénotype d'infectivité intermédiaire (tableau 6).

Le mutant unique M128A étant en cours de synthèse, pourrait être plus infectieux que les multiples mutants et nous pourrions ainsi tester l'effet des INLAIs sur un virus SIV porteur d'une intégrase humanisée.

MATERIEL ET METHODES

Le matériel et méthodes des résultats développés dans les parties I et III des résultats sont décrits dans les publications associées. Le matériel et méthodes développé ci-dessous correspond à la deuxième partie de mes résultats sur la caractérisation de l'effet des INLAIs sur la réplication du SIV en comparaison à leur mécanisme contre le VIH-1.

Antirétroviraux

Le Raltegravir (RAL) utilisé comme contrôle a été obtenu de Selleck Chemicals. Les molécules BI-D et BI-224436 de Boehringer Ingelheim [438] GS de Gilead et la molécule SHG065 de Shionogi ont également été testées.

Les autres composés testés 237 (BDM1 ou MUT-A), 713 (BDM2), 851, 872, 884, 887 et 916 ont été synthétisés par Mutabilis (brevet WO 2014/053666 publié le 10/04/2014).

Culture cellulaire

Nous avons utilisé des cellules 293T (Human embryonic kidney, HEK) transformées par l'antigène grand T de SV40) et des cellules TZM-bl qui correspondent à une lignée cellulaire HeLa (cellules épithéliales d'adénocarcinome humain) exprimant le récepteur CD4 et les corécepteurs CXCR4 et CCR du VIH-1 modifiée afin de contenir séparément deux copies intégrées des gènes Luciferase et β -galactosidase sous le contrôle d'un promoteur VIH-1. Ces cellules adhérentes sont cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GibcoBRL) complété avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF, Invitrogen) inactivé et 1% d'antibiotiques antimycosiques (50 UI/mL de pénicilline, 50 μ g/mL de sulfate de streptomycine et 125 ng/mL d'amphotéricine B, GibcoBRL) à 37°C sous 5% de CO₂. Les cellules MT4 (Human T cell leukaemia) en suspension sont cultivées dans un milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640, GibcoBRL) également complété avec 10% de SVF et 1% d'antibiotiques.

Constructions virales

Le plasmide codant pour la séquence complète du virus sauvage VIH-1 NL4-3 WT provient du NIH (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID) et le

plasmide codant pour le SIVmac 239 nous a été donné par Desrosiers [440]. Il s'agit d'un plasmide codant pour le provirus SIVmac 239 complet dont la séquence, vérifiée par criblage par diverses digestions enzymatiques, a été déposée au NIH (GenBank M33262) numéro du catalogue NIH #12249.

Une partie de la séquence du gène pol du plasmide SIVmac239 a été amplifiée par PCR Platinum® PCR SuperMix HiFi (Life Technologies) à l'aide des amorces SIV239-F3391 et SIV239-R5705Bam puis après digestion SbfI/BamHI a été lié spécifiquement dans un plasmide vecteur pUC18 par la T4 DNA Ligase (Fermentas). Ce vecteur pUC18-Pol SIV sert de cassette afin d'y insérer un gène synthétique contenant les mutations d'intérêt R95Q/ E125T, M128A et S171H/ E173K sur IN via les sites BglII. Enfin cette cassette pUC18-Pol-IN 5mut SIV permet le clonage de la séquence d'IN mutée dans le plasmide de départ codant pour le provirus SIVmac239 complet via les sites PacI/SbfI afin de produire le virus SIV IN 5 mut. Les virus SIV mut1 (S171H/ E173K) et mut4 (R95Q/ E125T) ont été produits par mutagenèse dirigée dans la cassette pUC18-Pol SIV ensuite réinsérée de la même manière dans le plasmide SIVmac239.

Séquence du gène synthétique IN 5 mut:

```
agatctagggacttggcaaatggattgtacctatctagagggaaaaataatcatagttgcagtacatgtagctagtgat
tcatagaagcagaggttaattccacaagagacaggagaacagacagcactatttctgttaaaattggcaggcagatggcct
attacacatctacacacagataatgggtgctaactttgcttcgcaaacagtaaaggcggttgcatggtgggcagggataga
gcacaccttgggtaccatacaatccacagagtcaggagtagtggaaagcaatgaatcaccacctgaaaaatcaaatag
atagaatcaggggaacaagcaaatcacgtaaaaaccatagtattaatggcagttcattgcatgaattttaaagaagggga
ggaataggggatgactccagcagaaagattaattaacatgatcactacagaacaagagatacaattcaacaatcaaa
aaactcaaaatttaaaatttccgggtctattacagagaaggcagagatcaactgtggaagggacccggtgagctattgt
ggaaaggggaaggagcagtcacttaaggtagggacagacattaaggtagtaccagaagaaaggctaaaattatcaaa
gattatggaggaggaaaagaggtgatagcagttccacatggaggataaccggagaggctagagaggtggcatagcctca
taaaatatctgaaatataaaactaaagatct
```

Production et dosage des stocks viraux

Les cellules 293Tensemencées dans du DMEM contenant 10% de SVF sans antibiotiques (DMEM+/-) à raison de $4 \cdot 10^6$ cellules/boîte de Pétri 10 cm (B10, Corning) sont transfectées le lendemain avec 18 µl d'agent transfectant (X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent, Roche) et 6 µg du plasmide pNL4-3 ou pSIVmac239 dans un volume final de 200 µL d'OptiMEM (GibcoBRL) par B10. 24 heures post-transfection les cellules sont rincées dans 5

ml de PBS 1X (GibcoBRL) puis remises en culture dans 10 ml DMEM+/- par B10. 48 heures post-transfection, le surnageant de culture est récolté et filtré à 0,45 µM (Dutscher). Puis l'ultracentrifugation de ces surnageant permet de les purifier et de les concentrer afin d'obtenir les différents stocks viraux. Pour la production de virus en présence d'inhibiteurs, les cellules sont également rincées 24 heures post-transfection et sont remises en culture dans du milieu DMEM+/- contenant 0,5% final de DMSO pour les stocks non traités, BDM2 à 2 µM pour le stock NL4-3 inactivé ou la molécule 884 à 40 µM pour le stock SIVmac 239 inactivé. La suite du protocole de production est identique à ce qui est décrit plus haut. Une remarque, l'ultracentrifugation permet d'éliminer le milieu contenant les différents inhibiteurs et les stocks « inactivés » sont resuspendus dans du milieu DMEM sans inhibiteurs.

Tous les stocks HIV-1 NL4-3 sont quantifiés par le dosage de la protéine virale CAp24 mesurée par un kit alliance HIV-1 p24 Antigen ELISA (Perkin Elmer) alors que le dosage de la protéine CAp27 des stocks SIV est réalisé via le kit ELISA de l'antigène p27 (ZeptoMetrix).

L'infectivité de chacun des stocks produits est également mesurée. Les cellules TZM-bl sontensemencées à 10^4 cellules par puits de plaque 96 puits la veille de l'infection. Des gammes de dilutions de virus au 1/5 à partir du stock pur sont réalisées afin d'infecter de façon sérielle ces cellules TZM-bl. 24h post-infection, les cellules sont fixées pendant 15 mins avec de la glutaraldéhyde 0,5% , rincées deux fois au PBS puis colorées via l'ajout d'un tampon (ferrocyanure de potassium 4 mM, ferricyanure de potassium 4 mM, $MgCl_2$ 2 mM) contenant du 0,14 mg/ml de X-Galactosidase (Roche). Ainsi le comptage des cellules infectées colorées en bleu correspond au dosage de l'expression du gène β -galactosidase et permet de quantifier le nombre de cellules infectées correspondant au titre de chaque stock en (unités infectieuses) UI/ml.

Multiplés cycles d'infection

Des expérimentations tests en présence d'une gamme de RAL au 1/3 allant jusqu'à 2 µM ont été réalisées avec différentes concentrations virales pour déterminer la moi de chaque virus à utiliser. Les cellules MT4 sont infectées en « pull » avec une moi (multiplicity of infection) de $6,25 \cdot 10^{-3}$ UI/φ pour le VIH-1 et une moi de 10^{-2} UI/φ pour le SIV. 2 heures post-infection les cellules sont rincées puisensemencées en plaque 96 puits à raison de 10^5 cellules/puits dans du milieu RPMI complet en présence d'inhibiteurs. La gamme de RAL est réalisée avec des dilutions au 1/3 allant jusqu'à 2 µM et les INLAIs avec des gammes au 1/5 allant jusqu'à 3 µM pour HIV-1 et 100 µM pour SIV. Un test de viabilité cellulaire utilisant le CellTiter-Glo luminescent reagent (Promega) est réalisé 5 ou 7 jours post-infection respectivement pour le

VIH-1 ou le SIV. Dans ce modèle cellulaire, la cytotoxicité étant directement corrélée à l'infectivité des virions en multiples cycles d'infection nous avons déterminé ainsi la concentration effective pour induire 50% de protection (EC50) de différents composés. Des conditions de cellules infectées en présence de DMSO à 0,5% ou de RAL à 2 μ M sont utilisées pour chaque expérimentation comme contrôle négatif ou positif respectifs du pourcentage de protection de la réplication virale globale du VIH-1 et du SIV.

Cycle unique d'infection

Tout comme pour les expérimentations en multiples cycles d'infection, des tests en présence d'une gamme de RAL montant à 2 μ M ont été réalisées pour déterminer la moi de chaque virus à utiliser. Les cellules TZM-bl sont infectées en « pull » avec une moi = 10^{-2} UI/ ϕ pour le VIH-1 et le SIV. 1 heure post-infection les cellules sont rincées puis ensemencées en plaque 96 puits à raison de 10^4 cellules/puits dans du milieu DMEM complet en présence d'inhibiteurs. Les mêmes gammes que celles décrites précédemment sont utilisées à l'exception faite que les gammes d'INLAIs allant jusqu'à 100 μ M sont utilisées pour le VIH-1 et le SIV. Sachant que les cellules TZM-bl possèdent un gène codant pour la luciférase sous le contrôle d'un promoteur viral, un dosage de la luciférase utilisant le One-Glo luminescent reagent (Promega) est réalisé 24 heures post-infection afin d'observer les étapes précoces de la réplication VIH-1 et SIV. De nouveau les conditions DMSO et RAL 2 μ M servent de contrôles indispensables au calcul des EC50 de chaque composé.

Western blot

Les protéines des stocks de virions VIH-1 et SIV sont dénaturées dans du tampon de migration Laemmli 2X (Sigma-Aldrich) contenant du SDS et du β -mercapto-éthanol puis par chauffage à 95°C pendant 5 mins. La récolte des cellules productrices des stocks de virus SIV WT et SIV IN 5 mut se fait par grattage, centrifugation et les cellules sont ensuite lysées à 4°C dans du tampon de lyse RIPA (50 mM Tris HCL pH 7,4, 2 mM EDTA, 300 mM NaCl et 1% de NP-40) complété avec un cocktail d'inhibiteur de protéases PI (Roche) pendant 30 mins. Les lysats cellulaires sont obtenus après centrifugation à 13200 rpm pendant 10 mins à 4°C puis élimination des culots contenant les débris cellulaires puis leur concentration protéique est déterminée par la méthode de dosage Bradford (Pierce).

Les protéines sont ensuite séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 12% dans un tampon de migration (25 mM Tris,

192 nM de glycine pH 8,3 0,1% SDS) puis transférées sur une membrane PVDF (Immunobilon-P, Millipore) dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 192 nM de glycine, SDS pH 8,3 complété avec 0,1% SDS et 20% d'éthanol) pendant 2h à 150 V ou pendant la nuit à 20 V. Les membranes sont saturées dans du TBS 0,05% Tween 20 (Sigma-Aldrich) contenant 5% de lait pendant 1h sous agitation puis incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS 0,05% Tween 20 5% de lait environ 2h à température ambiante ou pendant la nuit à 4°C. Les membranes subissent 4 lavages de 10 mins dans du TBS 0,05% Tween 20 puis elles sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP correspondant, également dilué dans du TBS 0,05% Tween 20 5% de lait, pendant 45 mins à température ambiante. Une dernière série de 4 lavages est réalisé puis la révélation des signaux chémo-luminescents est faite grâce au réactif ECL Prime (GE Healthcare).

Les anticorps primaires suivant ont été utilisés en western blot pour reconnaître les épitopes viraux du VIH-1 : anticorps monoclonal de souris anti-CAP24 VIH-1 Gag (ARP366 ; National Institute for Biotechnology), anticorps de lapin anti-RT VIH-1 (NIH), anticorps monoclonal de souris anti-IN VIH-1 (IN-2 ou sc-69721 ; Santa Cruz Biotechnology), anticorps monoclonal de souris anti-Env TMgp41 (41A, Hybridolab) et anticorps monoclonal de souris anti-Env VIH-1 SUgp120 (110H ; Hybridolab).

Pour reconnaître les épitopes du SIV nous avons utilisés : anticorps monoclonal de souris anti-CAP27 SIV Gag (KK64 ; NIH), anticorps monoclonal de souris anti-gp120 SIV (KK8 ; NIH), anticorps monoclonal de souris anti-gp41 SIV (KK841;NIH) et anticorps de lapin anti-Nef SIV (ARP4007 ; NIBSC).

Les anticorps secondaires contre les immunoglobulines G couplées à l'HRP de souris (Polyclonal Rabbit anti-Mouse Immunoglobulins/HRP) ou de lapin (Polyclonal Swine anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP) de chez Dako sont utilisés pour les western blot.

Construction et purification des protéines recombinantes

La protéine GST-LEDGF a été produite et purifiée à l'IGBMC (Marc Ruff).

Le plasmide codant pour la protéine recombinante His-IN VIH-1 a été décrit précédemment [441] et le protocole ayant permis le clonage du plasmide Flag-IN VIH-1 ainsi que la production de la protéine correspondante sont décrits la publication éditée dans *Retrovirology* [350].

Le plasmide codant pour la protéine IN-His SIVmac 239 nous a été donné par P.Cherepanov [437]. Des cellules BL21 DE3 pLysS (Merck) ont été transfectées avec ce plasmide et la

production de la protéine recombinante IN-His SIV a été induite par 0,5 mM IPTG (Invitrogen) ajouté à un milieu LB supplémenté avec 10% de sucrose, puis purifiée par chromatographie d'affinité. A l'aide des amorces OL786 et OL787 nous avons amplifié par PCR avec l'enzyme Platinum® PCR SuperMix HiFi (Life Technologies) la séquence IN SIV contenu dans ce plasmide en ajoutant une marque Flag en C-term. Après purification sur colonne (BioBasic) le produit de PCR IN-Flag SIV a ensuite été digéré avec les enzymes de restriction BamHI et XhoI afin d'être ligué spécifiquement dans un plasmide vecteur pGEX-6P1 (GE-Healthcare) par la T4 DNA Ligase (Fermentas). La protéine IN-Flag SIV codée par ce plasmide a également été transformée dans des cellules pLysS et purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne GSTrap HP (GE-Healthcare) en présence de la protéase PreScission afin d'éliminer spécifiquement la marque GST.

Les culots cellulaires bactériens correspondant à 1l de culture à une DO de 600 nm sont resuspendus dans 3,5 ml de tampon A (50 mM HEPES pH 7,5, 1M NaCl, 5mM MgCl₂, 2 mM BME, 7mM CHAPS, + Cocktail d'inhibiteur de protéases PI (Roche) + Benzonase ~ 1000 U i.e 5 µL). 20 g de billes de verre 150-212 µm sont ajoutés puis les cellules sont lysées par vortex pendant 10 mins à température ambiante. Les extraits cellulaires obtenus sont resuspendus dans 3 fois 15 ml de tampon A + PI et ultracentrifugés à 30 000 rpm pendant 1h. Après élimination du culot cellulaire, le surnageant est déposé sur des colonnes GSTrap HP (GE Healthcare) préalablement équilibrées avec du tampon A. La colonne est rincée avec du tampon A jusqu'au retour à une DO basale (280 nm). La protéase PreScission est diluée dans 10 ml de tampon A et déposée sur la colonne puis la colonne est incubée pendant la nuit à 4°C. Le lendemain, le flux de tampon A est relancé afin d'éluer toute la quantité de protéine disponible et des fractions de 2 ml sont collectées. La protéine de fusion non clivée, la GST relarguée et la protéase PreScission retenues sur la colonne sont ensuite éluées avec du tampon A contenant 20 nM de Glutathion. L'analyse des différentes fractions obtenues est réalisée par migration sur gel SDS-PAGE Bis-Tris acrylamide 10% NuPAGE, dans du tampon MES (Invitrogen). Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont ensuite regroupées et concentrées.

Interaction IN-LEDGF *in vitro*

Comme décrit dans la partie résultats, des expériences préliminaires de mise au point ont été nécessaires pour définir les conditions optimales de tampon, de format, de couple d'anticorps ou de concentrations de protéines pour nos tests HTRF IN-LEDGF.

Les essais HTRF sont réalisés en plaque 384 puits (Corning) dans un tampon IN-LEDGF (tampon HT50 1X :50 mM HEPES pH 7,3, 300 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 0,010% Tween-20, supplémenté de 0,4 M KF, 0,1% BSA et 1 mM DTT). 2 µl de gammes sérielles d'inhibiteurs (préalablement dilué au 1/3 dans du DMSO 25%) sont pré incubés pendant 30 mins à température ambiante avec 8 µl de mix IN contenant 10 mM IN marquée His avec 1X d'anticorps monoclonal anti-His conjugué au fluorophore d2 (Cisbio). Ensuite 10 µl de mix LEDF composé de 10 mM LEDGF marquée GST avec 1X d'anticorps monoclonal anti-GST conjugué au fluorophore K (Cisbio) sont ajoutés dans la plaque et celle-ci est incubée pendant 2h à température ambiante. La lecture de la fluorescence en temps résolu (excitation à 337 nm, double émission à 620 nm et 667 nm) est réalisée sur l'appareil PHERAstar. Le ratio HTRF est converti en pourcentage d'inhibition, grâce aux contrôles en présence de RAL et DMSO, afin de calculer l'IC₅₀ (concentration nécessaire pour induire 50% d'inhibition) de chaque molécule pour chacune des interactions LEDGF-IN VIH-1 ou SIV.

Multimérisation IN-IN *in vitro*

Comme cela a également été décrit dans la partie résultats, des expériences de mise au point ont été nécessaires pour définir les conditions optimales des tests HTRF IN-IN.

Les essais HTRF IN-IN sont également réalisées en plaque 384 puits dans un tampon HTR50 1X supplémenté avec 800 mM KF, 0,1% BSA et 1 mM DTT. Le format de dépôt utilisé est différent de celui HTRF IN-LEDGF. 2 µl de gammes sérielles d'inhibiteurs sont pré incubés pendant 30 mins à température ambiante avec 4 µl de protéine IN marquée Flag à 25 nM pour VIH-1 et 10 mM pour SIV. Puis 4 µl de protéine IN marquée His à 25 nM pour VIH-1 et 100 mM pour SIV sont ajoutés et la plaque est incubée pendant 3h à température ambiante. Enfin 10 µl de mix d'anticorps monoclonaux 1X anti-Flag-K et anti-His-d2 sont ajoutés et de nouveau incubés pendant 2h à température ambiante. La lecture de la fluorescence est réalisée comme décrit précédemment.

Tableau 7 : Liste des amorces utilisées

Nom des amorces	Séquence (5' → 3')
SIV239-F3391	CACACCCTGCAGGACTAGCAAAAAG
SIV239-R5705Bam	CAGTGGATCCTGTAGATCTTTAGTTTTATATTTTCAGATATTTTATG
OL786	TCCCCGGGATCCTTCTTGAAAAAGATAGAGCCAGCAC
OL787	TCCCCGCTCGAGTTACTTGTATCGTCGTCATCCTTGTAGTCTGCCACCTCTCTAGCCTCTCC

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les traitements antirétroviraux actuels ciblant majoritairement les enzymes virales comme la RT (reverse transcriptase) et la PR (protéase) sont très efficaces. Les recherches menées dans ce domaine depuis ces dernières années s'intéressent également au développement d'inhibiteurs de la troisième enzyme virale IN (intégrase). Ces antirétroviraux nommés INSTIs sont des inhibiteurs catalytiques de l'IN car via la fixation sur le site actif de l'enzyme ils inhibent efficacement l'étape d'intégration du cycle de réplication du VIH-1. Malgré l'efficacité des thérapies actuelles, l'éradication du VIH-1 n'est pas encore envisageable. En effet l'émergence de virus multirésistants contre l'ensemble des classes d'antirétroviraux et l'existence de réservoirs viraux de latence sont certains des facteurs à l'origine de rebonds de la virémie chez les patients traités et illustrent la nécessité de développer de nouveaux agents thérapeutiques innovants.

Parmi les cibles des antirétroviraux en cours de développement, l'intégrase conserve toujours une place de choix car son rôle est essentiel dans la réplication virale du VIH-1 et que des fonctions équivalentes aux siennes sont absentes dans les cellules humaines. Le principal cofacteur de l'IN du VIH-1 est la protéine cellulaire LEDGF/p75 (Lens Epithelium-Derived Growth Factor). Il s'agit d'une protéine nucléaire liée à la chromatine et son interaction avec l'IN permet de cibler les régions transcriptionnellement actives du génome de l'hôte afin que le provirus y soit préférentiellement intégré [433]. Le rôle clé de l'interaction IN-LEDGF lors de l'étape d'intégration du VIH-1 en fait une cible thérapeutique de premier ordre afin d'inhiber l'IN par un mécanisme d'action différent de celui des INSTIs.

Dans cette optique et suite à l'élucidation de la structure en trois dimensions de l'interface entre un dimère IN et son cofacteur LEDGF, différentes approches ont permis la découverte de petites molécules capables de se fixer efficacement sur l'interface de l'IN permettant la liaison de LEDGF. Cette classe d'antirétroviraux d'un nouveau genre ciblant une interaction protéique hôte-virus est décrite comme ayant une double activité antirétrovirale. En effet ces molécules inhibent les étapes précoces de la réplication du VIH-1 mais également, et de façon surprenante, ciblent de manière plus efficace les étapes tardives ce qui entraîne la production de virions défectueux en infectivité. Mon projet de thèse, réalisé en partenariat avec la société biopharmaceutique Mutabilis, s'est intéressé à la caractérisation de l'activité antirétrovirale d'une nouvelle classe d'INLAIs selon deux axes: (1) l'approfondissement des mécanismes d'action de ces INLAIs sur les étapes tardives de la réplication du VIH-1 ; (2) l'appréciation de leur spectre d'activité sur la réplication du virus de l'immunodéficience simienne (SIV).

I - Mécanisme d'action des INLAIs : inhibition de deux étapes distinctes de la réplication du VIH-1

Le mécanisme d'action des INLAIs a été étudié dans notre première publication de *Rétrovirology* « Dual inhibition of HIV-1 replication by integrase- LEDGF allosteric inhibitors is predominant at the post-integration stage ».

Les INLAIs sont considérés comme des inhibiteurs allostériques car leur fixation sur l'IN, non pas sur son site actif mais au niveau de sa région d'interaction avec LEDGF, induit l'inhibition de cette interaction et empêche également l'activité catalytique de l'IN lors de l'intégration du VIH-1.

La société biopharmaceutique Mutabilis a développé de nouveaux inhibiteurs candidats de cette interaction hôte-virus. Ces molécules dérivent de plusieurs séries chimiques originales de la famille des aryl ou heteroaryl-tertbutoxy-acetic acid. La molécule Mut101 présentée dans la publication parue dans *Retrovirology* fait partie des premiers composés synthétisés chez Mutabilis dont la structure quinoline est proche de celle du BI-D (Boehringer Ingelheim). La molécule BDM1 (ou MUTA) est le meilleur candidat d'une série chimique différente possédant un motif thiophène.

Afin de confirmer l'appartenance de ces molécules à la classe des inhibiteurs allostériques de l'IN nommés INLAIs, plusieurs expériences ont été réalisées afin de vérifier dans un premier temps leur capacité d'inhibition de l'interaction IN-LEDGF et de l'étape d'intégration. Il a également été démontré que, outre l'activité inhibitrice de l'interaction IN-LEDGF, MUT101 et la famille des INLAIs avaient une deuxième activité biochimique, à savoir celle de potentialiser les interactions entre sous-unités de IN en provoquant la multimérisation de IN.

Pour cela la co-cristallisation d'un dimère des domaines catalytiques (CCD) de l'intégrase en présence d'INLAIs a été réalisée et a permis de mettre en évidence que Mut101 se fixe efficacement sur cette interface CCD-CCD IN qui est le domaine de liaison à LEDGF. Des expériences *in vitro* ont également montré que Mut101 est capable d'induire une inhibition de l'interaction IN-LEDGF avec une efficacité (IC50) comparable à celle décrite dans la littérature pour d'autres types d'INLAIs [342]. De plus, Mut101 inhibe les réactions *in vitro* de 3' processing et de transfert de brin médiées par l'IN lors de l'étape d'intégration de la même manière que la molécule référence BI-D. Une expérience de « time-of-addition » (TOA) en cycle unique d'infection avec un virus Δ env pseudotypé VSVG a montré que Mut101 se comportait dans ces conditions d'une manière similaire au raltegravir (RAL), à savoir comme un inhibiteur spécifique de l'étape d'intégration.

Les infections en simple cycle permettent d'étudier, avec des virus Δ env non répliatifs, uniquement les étapes précoces de la réplication, jusqu'à l'intégration et l'expression du provirus. En revanche, les essais cellulaires de multiples cycles d'infection avec des virus répliatifs représentent la réplication du VIH-1 dans son ensemble regroupant donc les étapes précoces et tardives du cycle. En comparant l'activité antirétrovirale de MUT101 en cycle unique et multiples d'infection, nous avons été surpris de constater que l'activité en cycle unique était beaucoup plus faible que l'activité en cycles multiples. Ce résultat suggérait que MUT101 ne se comporte pas comme un simple inhibiteur de l'intégration et faisait suspecter une activité antirétrovirale supplémentaire à une étape plus tardive du cycle viral. De plus, le traitement de cellules productrices par MUT101, ne ciblant donc que les étapes tardives du cycle viral, a permis de confirmer la double activité antirétrovirale des INLAIs. L'efficacité des INLAIs étant étonnamment beaucoup plus forte dans les étapes tardives qu'au niveau de l'intégration. Ainsi, la double activité biochimique des INLAIs correspondait à une double activité antirétrovirale. Ces observations ont ensuite été corroborés avec plusieurs molécules de la classe des INLAIs [343,350,352] .

La perte de liaison de MUT101 sur l'interface CCD-CCD IN étant concomitante avec la perte d'activité dans les étapes tardives cela démontre que la double activité antirétrovirale des INLAIs est effectivement liée à leur fixation sur IN au niveau du site d'interaction de LEDGF. Afin d'expliquer le fait que ces deux activités différentes des INLAIs soient associées à un seul site de liaison sur une seule cible spécifique, nous avons été les premiers à proposer un modèle de compétition avec LEDGF. L'activité précoce des INLAIs au niveau de l'intégration, se déroulant dans le noyau, est liée à l'inhibition de l'interaction IN-LEDGF. Cette activité est contrecarrée par la compétition de LEDGF, protéine nucléaire très abondante, qui possède le même site de liaison sur l'IN que ces inhibiteurs. En revanche, leur activité tardive au niveau de la maturation des virions est liée à la deuxième activité biochimique des inhibiteurs qui est d'induire une multimérisation non fonctionnelle de l'IN. Cette activité se situant dans le cytoplasme, un environnement dépourvu de LEDGF, elle ne souffre pas de la compétition rencontrée dans le noyau au niveau de l'intégration. Ce modèle a été validé par le fait que dans des cellules LEDGF-/- l'activité inhibitrice à l'étape d'intégration (estimée en cycle unique d'infection) est bien meilleure que dans des cellules LEDGF +/- et est équivalente à l'activité globale (estimée en cycles multiples d'infection).

Ainsi, nous avons pu démontrer que les INLAIs, en tant qu'inhibiteurs d'une interaction protéine-protéine ont un mécanisme d'action tout à fait original et inattendu avec quatre caractéristiques majeures: (1) leur activité antirétrovirale au niveau de l'intégration du VIH-1 en inhibant l'interaction IN-LEDGF, (2) leur caractère allostérique associé à leur simple liaison sur IN, indépendamment de LEDGF, qui entraîne un remaniement conformationnel de

l'IN aboutissant à sa multimérisation anormale, (3) leur double activité antirétrovirale, l'inhibition de l'interaction IN-LEDGF et de l'intégration dans le noyau et l'inhibition des étapes tardives dans le cytoplasme via la multimérisation anormale de l'IN, (4) leur sensibilité à la compétition du partenaire cellulaire LEDGF de leur cible virale IN. Le mécanisme d'action des INLAIs est en réalité beaucoup plus complexe que leur simple effet d'inhibition d'interaction protéine-protéine pour lequel ils ont été initialement développés.

II - Etude structurale des virus VIH-1 inactivés par les INLAIs et de leur réactivité immunologique

Cette étude a fait l'objet du manuscrit « The HIV-1 integrase-LEDGF allosteric inhibitor MUT-A impairs virus maturation and infectivity but does not influence RNA packaging or virus immunoreactivity » en cours de révision.

A - Les INLAIs induisent la production de virions excentriques défectueux en infectivité

L'activité antirétrovirale des INLAIs dans les étapes tardives de la réplication du VIH-1 conduit à la production de virions ayant un défaut d'infectivité lorsqu'ils sont mis en contact de nouvelles cellules cibles en l'absence d'inhibiteurs [344,352]. Comme en présence de BI-D, nous avons montré que l'ajout de la molécule MUT-A (ou BDM1) dans les cellules productrices induit la libération de virions non infectieux. Ces particules virales ne présentant pourtant pas de défaut au niveau de leur maturation protéique ont également été caractérisées. L'empaquetage et la dimérisation de l'ARN viral au sein des virions ne sont pas altérés par la présence de BDM1. De plus ces particules virales contiennent l'enzyme transcriptase inverse (RT) sous forme fonctionnelle et l'ARNt cellulaire tous deux indispensables pour le démarrage de la transcriptase inverse dans les cellules cibles nouvellement infectées. Cependant plusieurs études ont montré que le défaut d'infectivité des virions produits en présence d'INLAIs est lié au fait qu'ils ne parviennent pas à achever l'étape de transcription inverse dans les cellules cibles [343,344,352].

Des études de microscopie électronique ont montré que jusqu'à 90% des virions produits en présence de différents types d'INLAIs dont le BI-D arborent une structure dite excentrique

[343,354]. Il s'agit d'une structure particulière où le complexe RNP (ribonucléoprotéine), composé de l'ARN viral et de protéines NC (nucléocapside), se retrouve à l'extérieur du core au niveau de la membrane virale. Il serait donc intéressant de réaliser des expériences de microscopie électronique sur les virions produits en présence de BDM1 pour vérifier que comme d'autres INLAIs cette molécule est associée à l'apparition de cette structure excentrique particulière.

Le mécanisme reliant la multimérisation non fonctionnelle de l'IN induite par les INLAIs et le défaut d'infectivité des virions produits n'est pas encore totalement élucidé. Les INLAIs sont capables de se fixer à l'IN dans des virus aussi bien « entrants » dans les cellules cibles, lors de l'étape d'intégration dans le noyau en compétition avec LEDGF, mais également « sortants » dans les cellules productrices, en se liant à l'IN dans le cytoplasme en l'absence de compétition. Une des hypothèses pour expliquer leur activité optimale sur les étapes tardives serait que les INLAIs perturbent la réplication virale en se liant sur les précurseurs polypeptidiques Pr160^{gag-pol} contenant l'IN en cours de synthèse [344]. Il serait donc intéressant d'étudier si les INLAIs sont également capables d'induire une multimérisation non fonctionnelle des précurseurs Pr160^{gag-pol} via l'IN dans les virions néosynthétisés ce qui pourrait ainsi perturber la maturation des particules virales.

Sachant que la présence d'ARNv est nécessaire à la formation de structure comprenant des complexes RNP excentriques, une seconde hypothèse de l'action des INLAIs vient d'être récemment proposée. Kessl et al. ont montré que l'IN est capable de se lier de manière directe et spécifique à l'ARN viral génomique au sein des virions [442]. La production de virus porteurs de mutations au niveau de ce site de fixation sur l'IN est corrélée à la formation de particules virales excentriques non infectieuses. De manière intéressante ils ont également suggéré que cette interaction IN-ARN viral dans les virions est inhibée lorsque la production virale se déroule en présence d'INLAIs. Bien que la forme d'oligomérisation fonctionnelle de l'IN au sein du virion ne soit pas totalement établie (probablement des tétramères), les INLAIs sont capables d'augmenter la multimérisation de l'IN à l'intérieur des virions [343,344,352]. Ainsi la multimérisation aberrante de l'IN induite par les INLAIs, dont les molécules synthétisées par Mutabilis, semble affecter la maturation normale des particules virales. Le mécanisme d'action des INLAIs sur les étapes tardives de la réplication du VIH-1 pourrait être, au moins en partie, associé à leur capacité d'induire une accumulation d'agrégats IN au sein des virions empêchant ainsi l'interaction fonctionnelle IN-ARN viral génomique qui semble jouer un rôle dans la morphogénèse virale. Dans l'étude de Kessl et al., la présence d'INLAIs (BI-D) dans les cellules productrices inhibe la liaison de l'IN sur l'ensemble de l'ARNv génomique dans les virions. Cette activité est spécifique des INLAIs car l'interaction IN-ARNv dans des virions VIH-1 porteur de la mutation de résistance

aux INLAI A128T est comparable à celle observée pour des virions sauvages. Il serait donc intéressant de tester l'effet d'autres séries chimiques d'INLAI, telles que les molécules synthétisées par Mutabilis, sur la capacité de l'IN à lier spécifiquement l'ARNv en réalisant des expériences de CLIP (cross-linking immunoprecipitation) permettant de définir les protéines liées spécifiquement à l'ARN.

Les mécanismes et les interactions moléculaires requis pour une morphogénèse virale correcte ne sont pas encore bien connus à l'exception du rôle de la NC dans la condensation du complexe RNP [443]. Cependant le complexe NC-ARNv est essentiel mais pas suffisant pour une morphogénèse virale correcte et l'interaction IN-ARNv semble également impliquée dans la formation de virions infectieux [442]. Il est important de noter que des différences de la liaison de l'IN et de la NC ont été mises en évidence sur de nombreuses régions de l'ARNv génomique. Par exemple, l'IN mais pas la NC montre une forte préférence de liaison dans la région TAR (trans activation response). Au contraire, l'IN ne se lie pas au Psi (packaging element) qui est la région de liaison préférentielle de la NC. Le pattern distinct des sites de liaison de l'IN et de la NC sur l'ARNv génomique suggère que ces protéines virales peuvent le lier simultanément à l'ARNv et permet d'envisager une action combinée de l'IN et de la NC dans la formation et la localisation correcte du complexe RNP à l'intérieur du core viral.

L'IN sous forme libre est peu soluble, mais son cofacteur cellulaire LEDGF est capable de stabiliser la protéine virale sous forme d'un tétramère soluble [236,281,295]. Comme les virions VIH-1 produits en présence ou en absence de LEDGF ont une infectivité similaire [357], LEDGF ne semble pas impliqué dans la morphogénèse des particules virales. Cela soulève la question de savoir comment les formes fonctionnelles IN sont maintenues dans les virions après le clivage protéolytique du précurseur Gag-Pol. Kessl et al. ont défini un ratio de 4 sous unités d'IN se liant à une molécule d'ARNv afin de former des points de nucléation reliant différentes molécules d'ARN entre elles [442]. L'interaction IN-ARNv semble être « mutualiste » car elle paraît « profitable » aux deux interactants. La liaison à l'ARNv pourrait assurer l'incorporation et la stabilisation sous forme fonctionnelle de l'IN à l'intérieur de la particule virale et l'IN semble à son tour contribuer à l'architecture correcte du complexe RNP en compactant les deux copies du génome viral via la liaison et la formation de ponts entre plusieurs régions différentes de l'ARNv dans des virions matures et infectieux.

Néanmoins il est important de noter qu'environ 200 copies d'IN pour seulement deux copies identiques d'ARNv génomique sont empaquetées au sein d'une seule particule virale VIH-1. Il est par exemple possible que l'interaction IN-ARNv exerce un effet lors des étapes d'assemblage des particules virales au sein de la cellule productrice, notamment sur le

précurseur polypeptidique de l'IN Pr160^{gag-pol}. Il n'est également pas exclu que l'IN possède un ou des rôles supplémentaires au cours de la morphogénèse virale encore méconnus qui pourraient eux aussi être la cible des INLAIs.

Sachant que les enzymes virales RT et IN jouent un rôle essentiel dans la réplication du VIH-1 elles sont les cibles privilégiées des thérapies antirétrovirales développées à ce jour. Les traitements antirétroviraux utilisés actuellement pour cibler l'IN sont basés sur l'administration d'un inhibiteur catalytique de l'IN (INSTI) et il est préconisé de le combiner avec deux inhibiteurs de la RT. Les patients en échec thérapeutique suite à ce type de traitement développent dans la majeure partie des cas des mutations de résistance simultanées sur les deux enzymes virales cibles ce qui induit une double insensibilisation concomitante aux inhibiteurs de RT et d'IN. Au regard de l'existence de réseaux de coévolution de l'IN et de la RT, nous pouvons supposer que ces protéines virales peuvent s'influencer l'un l'autre au niveau de leur fonctionnalité au cours de la réplication virale. En effet il a notamment été montré que la nature de la RT influence fortement l'efficacité du processus d'intégration médiée par l'IN. La caractérisation du ou des rôle(s) de l'interaction IN-RT au cours de la réplication virale pourrait nous permettre d'améliorer nos connaissances sur les différentes fonctions de l'IN sur l'ensemble des étapes du cycle répliatif du VIH-1. Il serait également intéressant d'étudier si, comme pour les INSTIs, des mutations simultanées sur la RT et l'IN confèrent une résistance croisées aux INLAIs et aux inhibiteurs de la RT.

B - Les INLAIs, potentiels agents thérapeutiques aux multiples facettes

La société Mutabilis a développé des molécules faisant partie de la classe des INLAIs qui possèdent une activité antirétrovirale puissante sur la réplication du VIH-1. L'efficacité des INLAIs, y compris le composé Mut101, est maintenue sur des virus porteurs de mutations de résistance à différentes classes d'antirétroviraux dont les INSTIs [350]. A ce jour aucun inhibiteur de cette famille n'a été soumis à un essai clinique. Boehringer Ingelheim (BI) avait tenté d'initier une étude de phase I avec l'inhibiteur BI224436, mais cet essai a été abandonné très rapidement pour une raison inconnue. Depuis BI s'est retiré du champ des antirétroviraux et a licencié son inhibiteur à Gilead. La molécule sélectionnée par Mutabilis comme son meilleur candidat est actuellement en phase de développement préclinique. D'ici

une ou deux années, une validation de l'utilisation des INLAIs en essai clinique de phase II peut être envisagée.

Malgré l'apparition de résistances aux INLAIs, la combinaison de ces inhibiteurs allostériques de l'IN avec des inhibiteurs catalytiques INSTIs est certainement une voie thérapeutique d'avenir. En effet, la nature synergique de l'activité des INSTIs et des INLAIs suggère la potentialité de la mise au point d'un traitement combinant ces deux classes d'antirétroviraux. De plus, les INLAIs inhibant efficacement la réplication des virus résistants aux INSTIs leur utilisation dans un traitement de seconde intention des patients en échec thérapeutique lié aux INSTIs est également envisageable.

Nous avons également testé l'immunoréactivité des virions produits en présence du BDM1. Les résultats obtenus montrent que ces virions inactivés non infectieux conservent une capacité de reconnaissance et de présentation par les cellules dendritiques aux lymphocytes T similaire à des particules virales non traitées. Les cellules dendritiques stimulées par les virions produits en présence de BDM1 permettent ainsi l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ tout comme les virus sauvages. De plus, l'étude de la production de cytokines et chimiokines dans le milieu de co-culture montre que ces virions sont capables d'induire une réponse immunitaire spécifique de type Th1 toujours avec une efficacité comparable à ce qui est observé avec des virions VIH-1 non traités. Dans un autre registre, nous avons observé que les épitopes de virus produits en présence de BDM1 ou non traités sont reconnus de manière similaire par un panel d'anticorps neutralisants ou non neutralisants spécifiques de l'enveloppe virale. Cela suggère que la réactivité immunologique des virions n'est pas altérée par la présence d'INLAIs lors de la production virale. L'ensemble de ces résultats montre que la production de virions en présence d'INLAIs, ici le BDM1, n'influence pas la structure glycoprotéique de l'enveloppe virale et permet ainsi le maintien d'une immunoréactivité T et B du même ordre que des virions sauvages.

Les multiples populations de VIH sont caractérisées par une grande diversité génétique. Cette diversification est associée à une grande variabilité antigénique qui joue un rôle essentiel dans l'échappement du VIH-1 à la réponse immunitaire de l'hôte et demeure encore aujourd'hui l'un des obstacles majeurs pour le développement d'une stratégie vaccinale efficace. Sachant que la variabilité génétique de la protéine d'enveloppe virale, notamment au niveau de la boucle V3 de la gp120, est l'un des obstacles majeurs à l'élaboration de vaccins préventifs basés sur l'utilisation d'anticorps neutralisants à large spectre (bNAbs), les virions inactivés par BDM1 maintenant une intégrité de leur glycoprotéine d'enveloppe pourraient être testés comme immunogène pour la production de ce type d'anticorps. En effet, les bNAbs sont depuis longtemps considérés comme la

protection vaccinale optimale car ils sont associés à la prévention de la plupart des pathologies virales répertoriées à ce jour. Le trimère de glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 est aujourd'hui défini comme l'immunogène potentiel majeur pour activer la réponse B et la production de bNAbs. Les virus inactivés en présence d'INLAIs produites par Mutabilis arborant une enveloppe virale sous une forme native, avec une structure des virions globalement bien conservée excepté le caractère excentrique des RNP du core viral, ils pourraient donc représenter de bons candidats en tant qu'immunogènes pour tester leur capacité à induire par immunisation la production d'anticorps de type bNAbs contre le VIH-1. Cependant de nombreuses expériences test, telle que le degré d'inactivation de ces virions en modèle animal d'infection *in vivo* et la vérification de la stimulation de lymphocytes B naifs, sont nécessaires avant d'envisager à plus long terme une exploitation en ce sens de ce type d'immunogène.

Une des limites importantes pour l'éradication du VIH-1 est l'existence de réservoirs de latence. Les réservoirs cellulaires de latence, constitués majoritairement de lymphocytes T CD4 mémoires, sont caractérisés par un état d'infection non productif mais réversible après réactivation. Ces cellules ont une demi-vie longue (44 mois) durant laquelle la réactivation peut avoir lieu et permettre la production de nouvelles particules virales [148]. Le laboratoire de Stéphane Emiliani a montré que la protéine cellulaire LEDGF joue un rôle dans l'établissement de la latence via le recrutement des protéines cellulaires IWS1 et SPT6 sur les régions LTR du provirus ce qui empêche l'expression du génome viral intégré [158]. En effet, la déplétion de la protéine LEDGF entrave la réactivation du VIH-1 dans des cellules en culture. En plus de leur activité inhibitrice de l'interaction IN-LEDGF, étape nécessaire au ciblage de l'intégration dans des régions transcriptionnellement actives du génome de l'hôte, il a été mis en évidence que les INLAIs entraînent également une relocalisation de l'intégration sur de nouvelles régions cibles. Ce changement de ciblage de l'intégration sur des régions moins actives transcriptionnellement semble être associé à la formation d'un réservoir de latence réfractaire à la réactivation du VIH-1 [444]. Ainsi un nouveau modèle de stratégie utilisant les INLAIs pour diminuer la réactivation des réservoirs de latence a été proposé et il serait intéressant de tester l'effet de différents types d'INLAIs, notamment ceux développés par Mutabilis, sur la réactivation de réservoirs de latence du VIH-1.

III - Un modèle simien envisageable pour l'activité des INLAIs ?

Cette étude qui correspond à la dernière partie de mes résultats, fera l'objet d'un manuscrit aujourd'hui en préparation.

Le virus de l'immunodéficience simienne (SIV) cause chez leurs hôtes non naturels, notamment chez les macaques, une infection persistante associée la déplétion progressive de lymphocytes T CD4+ provoquant des symptômes similaires au SIDA chez l'Homme [391]. Le SIV de macaques (SIVmac) est donc considéré comme le modèle animal le plus biologiquement relevant et le plus largement utilisé pour étudier l'infection par le VIH-1 et le SIDA dans son ensemble. Sachant que l'interaction IN-LEDGF joue un rôle crucial dans l'étape d'intégration de la plupart des lentivirus animaux [280] et que le virus SIVmac a été identifié comme un bon outil d'étude de l'effet des mutations de résistance aux INSTIs [403], nous avons testé le spectre d'activité de différents INLAIs sur la réplication du SIV.

Dans le but de comparer l'efficacité de composés provenant de différentes familles chimiques d'INLAIs, nous avons testé plusieurs molécules synthétisées par Mutabilis nommées 237 (BDM1), 713 (BDM2), 851, 872, 884, 887 et 916 et nous avons ajouté à notre étude les composés BI-D et BI-224436 (Boehringer Ingelheim), le composé GS (Gilead) et la molécule SHG065 (Shionogi). Le composé BI-D étant le premier INLAI à avoir été décrit, il sert donc de molécule de référence dans l'étude de cette classe d'antirétroviraux.

Le Raltegravir (RAL), comme tous les INSTIs inhibiteurs catalytiques de l'intégrase, possède une activité similaire sur le SIV et le VIH-1 [405]. En effet nous avons confirmé ces résultats dans nos expériences en cycle unique (EC50 RAL VIH-1 de 7 nM et 9 nM pour SIV) ainsi qu'en multiples cycles d'infection (VIH-1 10 nM et SIV 4 nM). Ainsi nous avons ajouté le RAL comme contrôle positif dans l'ensemble de nos essais sur la réplication SIV.

L'ensemble des INLAIs testé dans notre essai est capable d'inhiber l'interaction *in vitro* LEDGF-IN SIV. Néanmoins pour la majorité de ces molécules, regroupant des composés synthétisés par Mutabilis et des INLAIs ayant une structure chimique différente, l'activité inhibitrice contre SIV est 100-500 fois moins efficace que ce qui est observé pour le VIH-1. Malgré ce constat, nous avons pu montrer que le composé 884, faisant partie de la dernière série chimique développée par Mutabilis, possède une efficacité comparable sur les IN des deux lentivirus : avec seulement un ratio d'efficacité SIV/VIH-1 d'un facteur 1/4. Ces observations sont corrélées avec les résultats obtenus dans des expériences en unique cycle d'infection (avec une EC50 de nouveau d'un ratio SIV/VIH-1 de 1/4). Cela suggère que l'activité antirétrovirale des INLAIs sur les étapes précoces de la réplication virale via

l'inhibition de l'interaction IN-LEDGF semble être équivalente sur les lentivirus VIH-1 et SIV. Cependant il est important de noter que les expériences en cycle unique ont été réalisées 24 heures post-infection afin de n'observer théoriquement que l'effet sur les étapes précoces mais de nouvelles manipulations avec un virus SIV Δenv nous permettrait de confirmer ces observations.

En ce qui concerne les étapes tardives de la réplication du SIV l'activité des INLAIs est tout autre. Les expériences en multiples cycles d'infection montrent que la plupart des INLAIs sont peu ou pas capables d'inhiber les étapes tardives de la réplication du SIV. La majorité des INLAIs montre une EC50 de l'ordre de 10 μM contre la réplication du SIV cependant ces valeurs restent bien en dessous de l'efficacité observée pour le VIH-1 (EC50 entre 60 et 2 nM). Le composé 884, identifié comme le plus efficace sur les étapes précoces de la réplication du SIV, et également le plus efficace sur les étapes tardives avec une EC50 de 1 μM pour SIV. Cependant lorsque l'on observe le ratio d'efficacité SIV/VIH-1 on constate un facteur de 55, largement supérieur au facteur 4 obtenu sur les étapes précoces. De plus nous avons produit des virions SIV en présence du composé 884 et les résultats montrent que l'infectivité de ces virions n'est diminuée que de 50 fois en comparaison avec des virus sauvages. Au contraire, les virions VIH-1 produits en présence de BDM2 ont une infectiosité non détectable après 5 jours d'infection. L'ensemble de ces résultats suggère que les INLAIs ne parviennent pas ou peu à induire l'inhibition des étapes tardives de la réplication du SIV, phénomène caractéristique de leur activité antirétrovirale la plus efficace contre le VIH-1.

L'absence d'activité ou l'activité limitée des INLAIs sur SIV, en comparaison avec leur effet sur la réplication du VIH-1 est réminiscente du comportement des inhibiteurs allostériques de la RT, les NNRTIs. Il semble donc que les inhibiteurs allostériques en général ont un spectre d'activité beaucoup plus étroits que celui des inhibiteurs catalytiques, que ce soit pour l'IN ou pour la RT. La même observation en ce qui concerne le défaut d'activité des INLAIs sur HIV-2, comme pour les NNRTIs, a également été faite.

L'activité antirétrovirale des INLAIs sur les étapes tardives de la réplication du VIH-1 étant corrélée à leur capacité d'induire une multimérisation non fonctionnelle de l'IN, l'augmentation de l'interaction IN-IN SIV *in vitro* a également été testée. Alors que l'utilisation d'une gamme d'INLAIs allant jusqu'à 3 μM est amplement suffisante pour observer une multimérisation IN-IN VIH-1, des gammes allant jusqu'à 300 μM , y compris pour le composé 884, sont utilisées pour le SIV mais ne permettent pas d'atteindre un plateau de multimérisation maximum. Ces résultats suggèrent que la capacité des INLAIs à induire la multimérisation IN-IN n'est pas conservée contre le SIV.

Dans le but de développer un modèle simien pour l'étude des INLAIs, nous tentons de développer des virus SIV porteurs de mutations « humanisées » sur l'IN afin d'étudier si le phénotype des INLAIs sur le VIH-1 peut ainsi être restauré contre le SIV. Pour l'instant, aucun des mutants que nous avons produits n'est assez infectieux pour envisager ce type d'étude. Une autre possibilité serait d'utiliser un virus chimérique SHIV (Simiain/Human immunodeficiency virus) contenant uniquement l'IN du VIH-1 comme contrôle positif. Nous avons réalisé des expériences préliminaires en produisant un stock de virus chimérique SHIV contenant les gènes codants pour la RT et l'IN du VIH-1 insérés dans un génome viral SIV (don de l'équipe E. Ido [445]). Nous ne sommes pas parvenus à produire ce virus chimérique avec une quantité de p27 ou une infectivité détectable.

Une étude en microscopie électronique afin d'observer ou non la production de virions SIV arborant une structure eccentricité suite à la présence d'INLAIs pourrait nous indiquer dans un premier temps si la délocalisation du complexe RNP semble avoir lieu dans les virions SIV tout comme c'est le cas dans les particules virales VIH-1 produites en présence d'INLAIs.

Par la suite, il serait donc intéressant de chercher à caractériser l'activité réduite des INLAIs sur les étapes tardives de la réplication du SIV. Sachant que la liaison de l'IN à l'ARNv génomique décrite par Kessl et al. affiche une haute sélectivité pour des éléments de structure d'ARN spécifiques sur l'ensemble du génome viral dont les séquences TAR et RRE [442], nous pourrions essayer de déterminer si ces régions sur l'ARNv simien peuvent permettre son interaction avec l'IN SIV. En effet, le SIV est plus proche génétiquement du VIH-2 qui possède une structure TAR très différente de celle du VIH-1 ainsi la fixation de l'IN sur la séquence TAR de l'ARNv pourrait donc être différente selon les lentivirus. La comparaison des éléments structurels d'ARN sur le génome viral VIH-1 et SIV et de leur affinité pour l'IN de ces différents lentivirus pourrait nous permettre d'expliquer, au moins en partie, l'activité diminuée des INLAIs sur la réplication du SIV.

De plus, certains résidus sur le domaine CTD de l'IN du VIH-1 impliqués dans son interaction avec l'ARNv ont pu être identifiés [442] et leur mutation compromet l'interaction IN-ARNv sans affecter d'autres fonctions connues de l'IN ce qui induit la production de virions eccentricité non infectieux. En addition de la comparaison des résidus impliqués dans la fixation des INLAIs sur le dimère CCD-CCD IN, il serait donc intéressant d'étudier les différences de séquences entre IN VIH-1 et SIV au niveau du domaine CTD impliqué dans l'interaction avec l'ARNv.

Ainsi l'analyse de l'effet des INLAIs sur SIV et l'identification du ou des facteurs impliqué(s) dans la diminution de leur activité sur la réplication du SIV semble être un bon modèle

d'étude pour approfondir le spectre des caractéristiques spécifiques du mécanisme d'action complexe des INLAIs sur la réplication du VIH-1. Afin d'élargir nos connaissances à ce sujet, nous pourrions également nous intéresser aux mutations pléiotropiques de l'IN de classe II. En effet, certaines de ces mutations induisent la production de particules virales eccentrices, structure similaire à ce qui est observé en présence d'INLAIs ou de l'inhibition de l'interaction IN-ARNv dans les virions. Il serait donc intéressant de tester si les mutants de classe II inhibant les étapes tardives de la réplication du VIH-1 ont un effet sur l'interaction IN-ARNv dans les particules virales de différents lentivirus.

D'autre part, l'approfondissement de la caractérisation de l'activité des INLAIs sur la réplication du SIV est nécessaire avant d'envisager à plus long terme d'utilisation d'un modèle simien. Nous pourrions dans un premier temps réaliser des expériences en cellules primaires PBMC simiennes afin de comparer leur effet aux résultats obtenus *in vitro* et sur des expériences en cycle unique et multiples d'infection sur des lignées de cellules humaines.

REFERENCES

REFERENCES

1. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, et al. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305: 1425-1431.
2. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, et al. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
3. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, et al. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224: 500-503.
4. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497-500.
5. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, et al. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225: 840-842.
6. Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, et al. (1986) Human immunodeficiency viruses. *Science* 232: 697.
7. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, et al. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233: 343-346.
8. Liu J, Bartsaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S (2008) Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* 455: 109-113.
9. Gelderblom HR, Ozel M, Pauli G (1989) Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch Virol* 106: 1-13.
10. Ott DE (2008) Cellular proteins detected in HIV-1. *Rev Med Virol* 18: 159-175.
11. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, et al. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393: 648-659.
12. Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, et al. (1998) A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280: 1949-1953.
13. Bukrinskaya A (2007) HIV-1 matrix protein: a mysterious regulator of the viral life cycle. *Virus Res* 124: 1-11.
14. Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, et al. (2006) Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11364-11369.
15. Briggs JA, Grunewald K, Glass B, Forster F, Krausslich HG, et al. (2006) The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions. *Structure* 14: 15-20.
16. Byeon JJ, Meng X, Jung J, Zhao G, Yang R, et al. (2009) Structural convergence between Cryo-EM and NMR reveals intersubunit interactions critical for HIV-1 capsid function. *Cell* 139: 780-790.
17. Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Yeager M (2011) Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature* 469: 424-427.
18. Levin JG, Guo J, Rouzina I, Musier-Forsyth K (2005) Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: critical role in reverse transcription and molecular mechanism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 80: 217-286.
19. Berkhout B, Gorelick R, Summers MF, Mely Y, Darlix JL (2008) 6th international symposium on retroviral nucleocapsid. *Retrovirology* 5: 21.

20. Thomas JA, Gagliardi TD, Alvord WG, Lubomirski M, Bosche WJ, et al. (2006) Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid zinc-finger mutations cause defects in reverse transcription and integration. *Virology* 353: 41-51.
21. Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F, Thiriart C, Francotte M, et al. (1989) Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59: 103-112.
22. Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256: 1783-1790.
23. Jacobo-Molina A, Ding J, Nanni RG, Clark AD, Jr., Lu X, et al. (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6320-6324.
24. Zhang J, Tamilarasu N, Hwang S, Garber ME, Huq I, et al. (2000) HIV-1 TAR RNA enhances the interaction between Tat and cyclin T1. *J Biol Chem* 275: 34314-34319.
25. Cullen BR (2005) Human immunodeficiency virus: nuclear RNA export unwound. *Nature* 433: 26-27.
26. Daugherty MD, Liu B, Frankel AD (2010) Structural basis for cooperative RNA binding and export complex assembly by HIV Rev. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1337-1342.
27. D'Agostino DM, Felber BK, Harrison JE, Pavlakis GN (1992) The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs. *Mol Cell Biol* 12: 1375-1386.
28. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, et al. (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302: 1056-1060.
29. Mehle A, Strack B, Ancuta P, Zhang C, McPike M, et al. (2004) Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 279: 7792-7798.
30. Kao S, Khan MA, Miyagi E, Plishka R, Buckler-White A, et al. (2003) The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol* 77: 11398-11407.
31. Goila-Gaur R, Strebel K (2008) HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* 5: 51.
32. Le Rouzic E, Benichou S (2005) The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 2: 11.
33. Roesch F, Richard L, Rua R, Porrot F, Casartelli N, et al. (2015) Vpr Enhances Tumor Necrosis Factor Production by HIV-1-Infected T Cells. *J Virol* 89: 12118-12130.
34. Zhao RY, Bukrinsky MI (2014) HIV-1 accessory proteins: VpR. *Methods Mol Biol* 1087: 125-134.
35. Goffinet C, Allespach I, Homann S, Tervo HM, Habermann A, et al. (2009) HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor. *Cell Host Microbe* 5: 285-297.
36. Caillet M, Janvier K, Pelchen-Matthews A, Delcroix-Genete D, Camus G, et al. (2011) Rab7A is required for efficient production of infectious HIV-1. *PLoS Pathog* 7: e1002347.
37. Roy N, Pacini G, Berlioz-Torrent C, Janvier K (2014) Mechanisms underlying HIV-1 Vpu-mediated viral egress. *Front Microbiol* 5: 177.
38. Landi A, Iannucci V, Nuffel AV, Meuwissen P, Verhasselt B (2011) One protein to rule them all: modulation of cell surface receptors and molecules by HIV Nef. *Curr HIV Res* 9: 496-504.
39. Pizzato M, Helander A, Popova E, Calistri A, Zamborlini A, et al. (2007) Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6812-6817.
40. Laguette N, Bregnard C, Benichou S, Basmaciogullari S (2010) Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Mol Aspects Med* 31: 418-433.
41. Rosa A, Chande A, Ziglio S, De Sanctis V, Bertorelli R, et al. (2015) HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature* 526: 212-217.
42. Usami Y, Wu Y, Gottlinger HG (2015) SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* 526: 218-223.

43. Alizon M, Sonigo P, Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Tiollais P, et al. (1984) Molecular cloning of lymphadenopathy-associated virus. *Nature* 312: 757-760.
44. Wain-Hobson S, Sonigo P, Danos O, Cole S, Alizon M (1985) Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 40: 9-17.
45. Marcello A, Lusic M, Pegoraro G, Pellegrini V, Beltram F, et al. (2004) Nuclear organization and the control of HIV-1 transcription. *Gene* 326: 1-11.
46. Robinson HL (2002) New hope for an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol* 2: 239-250.
47. Barboric M, Nissen RM, Kanazawa S, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM (2001) NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 8: 327-337.
48. Jeang KT, Xiao H, Rich EA (1999) Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem* 274: 28837-28840.
49. Stoltzfus CM, Madsen JM (2006) Role of viral splicing elements and cellular RNA binding proteins in regulation of HIV-1 alternative RNA splicing. *Curr HIV Res* 4: 43-55.
50. Schwartz S, Felber BK, Benko DM, Fenyo EM, Pavlakis GN (1990) Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 64: 2519-2529.
51. Henderson LE, Sowder RC, Copeland TD, Oroszlan S, Benveniste RE (1990) Gag precursors of HIV and SIV are cleaved into six proteins found in the mature virions. *J Med Primatol* 19: 411-419.
52. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, et al. (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331: 280-283.
53. Kuzembayeva M, Dilley K, Sardo L, Hu WS (2014) Life of psi: how full-length HIV-1 RNAs become packaged genomes in the viral particles. *Virology* 454-455: 362-370.
54. Peterlin BM, Trono D (2003) Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 3: 97-107.
55. Engelman A, Cherepanov P (2012) The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol* 10: 279-290.
56. Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, et al. (2008) The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol* 6: 143-155.
57. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW (2012) HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
58. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, et al. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312: 763-767.
59. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, et al. (1984) T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312: 767-768.
60. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877.
61. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, et al. (1996) CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272: 1955-1958.
62. Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, et al. (1998) A new classification for HIV-1. *Nature* 391: 240.
63. Buzon V, Natrajan G, Schibli D, Campelo F, Kozlov MM, et al. (2010) Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. *PLoS Pathog* 6: e1000880.
64. Melikyan GB (2008) Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* 5: 111.
65. Miyauchi K, Kim Y, Latinovic O, Morozov V, Melikyan GB (2009) HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* 137: 433-444.
66. Grewe C, Beck A, Gelderblom HR (1990) HIV: early virus-cell interactions. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3: 965-974.

67. Arhel N (2010) Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 7: 96.
68. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, et al. (2007) HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J* 26: 3025-3037.
69. Campbell EM, Hope TJ (2015) HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* 13: 471-483.
70. Guo F, Cen S, Niu M, Javanbakht H, Kleiman L (2003) Specific inhibition of the synthesis of human lysyl-tRNA synthetase results in decreases in tRNA(Lys) incorporation, tRNA(3)(Lys) annealing to viral RNA, and viral infectivity in human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 77: 9817-9822.
71. Kim JK, Palaniappan C, Wu W, Fay PJ, Bambara RA (1997) Evidence for a unique mechanism of strand transfer from the transactivation response region of HIV-1. *J Biol Chem* 272: 16769-16777.
72. Hughes SH (2015) Reverse Transcription of Retroviruses and LTR Retrotransposons. *Microbiol Spectr* 3: MDNA3-0027-2014.
73. Lewis PF, Emerman M (1994) Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 68: 510-516.
74. Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, et al. (1992) Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6580-6584.
75. Bin Hamid F, Kim J, Shin CG (2016) Cellular and viral determinants of retroviral nuclear entry. *Can J Microbiol* 62: 1-15.
76. Bichel K, Price AJ, Schaller T, Towers GJ, Freund SM, et al. (2013) HIV-1 capsid undergoes coupled binding and isomerization by the nuclear pore protein NUP358. *Retrovirology* 10: 81.
77. Popov S, Rexach M, Ratner L, Blobel G, Bukrinsky M (1998) Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 273: 13347-13352.
78. Fassati A, Gorlich D, Harrison I, Zaytseva L, Mingot JM (2003) Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7. *EMBO J* 22: 3675-3685.
79. Hearps AC, Jans DA (2006) HIV-1 integrase is capable of targeting DNA to the nucleus via an importin alpha/beta-dependent mechanism. *Biochem J* 398: 475-484.
80. Depienne C, Roques P, Creminon C, Fritsch L, Casseron R, et al. (2000) Cellular distribution and karyophilic properties of matrix, integrase, and Vpr proteins from the human and simian immunodeficiency viruses. *Exp Cell Res* 260: 387-395.
81. Yamashita M, Emerman M (2005) The cell cycle independence of HIV infections is not determined by known karyophilic viral elements. *PLoS Pathog* 1: e18.
82. Krishnan L, Matreyek KA, Oztop I, Lee K, Tipper CH, et al. (2010) The requirement for cellular transportin 3 (TNPO3 or TRN-SR2) during infection maps to human immunodeficiency virus type 1 capsid and not integrase. *J Virol* 84: 397-406.
83. Cribier A, Segeral E, Delelis O, Parissi V, Simon A, et al. (2011) Mutations affecting interaction of integrase with TNPO3 do not prevent HIV-1 cDNA nuclear import. *Retrovirology* 8: 104.
84. Valle-Casuso JC, Di Nunzio F, Yang Y, Reszka N, Lienlaf M, et al. (2012) TNPO3 is required for HIV-1 replication after nuclear import but prior to integration and binds the HIV-1 core. *J Virol* 86: 5931-5936.
85. De Iaco A, Santoni F, Vannier A, Guipponi M, Antonarakis S, et al. (2013) TNPO3 protects HIV-1 replication from CPSF6-mediated capsid stabilization in the host cell cytoplasm. *Retrovirology* 10: 20.
86. De Rijck J, Debyser Z (2006) The central DNA flap of the human immunodeficiency virus type 1 is important for viral replication. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 1100-1110.
87. Limon A, Nakajima N, Lu R, Ghory HZ, Engelman A (2002) Wild-type levels of nuclear localization and human immunodeficiency virus type 1 replication in the absence of the central DNA flap. *J Virol* 76: 12078-12086.

88. Bushman F, Lewinski M, Ciuffi A, Barr S, Leipzig J, et al. (2005) Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat Rev Microbiol* 3: 848-858.
89. Lewinski MK, Bisgrove D, Shinn P, Chen H, Hoffmann C, et al. (2005) Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription. *J Virol* 79: 6610-6619.
90. Gottlinger HG (2001) The HIV-1 assembly machine. *AIDS* 15 Suppl 5: S13-20.
91. Freed EO (2015) HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol* 13: 484-496.
92. Maeda K, Almofty SA, Singh SK, Eid MM, Shimoda M, et al. (2013) GANP interacts with APOBEC3G and facilitates its encapsidation into the virions to reduce HIV-1 infectivity. *J Immunol* 191: 6030-6039.
93. Wlodawer A, Erickson JW (1993) Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu Rev Biochem* 62: 543-585.
94. Li S, Hill CP, Sundquist WI, Finch JT (2000) Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature* 407: 409-413.
95. Wiegers K, Rutter G, Kottler H, Tessmer U, Hohenberg H, et al. (1998) Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J Virol* 72: 2846-2854.
96. Kaplan AH, Zack JA, Knigge M, Paul DA, Kempf DJ, et al. (1993) Partial inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles. *J Virol* 67: 4050-4055.
97. Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, et al. (1998) Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8869-8873.
98. Cooper DA, Gold J, Maclean P, Donovan B, Finlayson R, et al. (1985) Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1: 537-540.
99. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, St Clair MH, Lehrman SN, et al. (1985) 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7096-7100.
100. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, et al. (1987) The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med* 317: 185-191.
101. Hammer SM, Katzenstein DA, Hughes MD, Gundacker H, Schooley RT, et al. (1996) A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. *N Engl J Med* 335: 1081-1090.
102. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emimi EA, et al. (1995) Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373: 117-122.
103. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, et al. (1995) Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373: 123-126.
104. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, et al. (1997) Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 387: 188-191.
105. Burton A (2003) Enfuvirtide approved for defusing HIV. *Lancet Infect Dis* 3: 260.
106. Nguyen BY, Isaacs RD, Teppler H, Leavitt RY, Sklar P, et al. (2011) Raltegravir: the first HIV-1 integrase strand transfer inhibitor in the HIV armamentarium. *Ann N Y Acad Sci* 1222: 83-89.
107. Hare S, Smith SJ, Metifiot M, Jaxa-Chamiec A, Pommier Y, et al. (2011) Structural and functional analyses of the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir (S/GSK1349572). *Mol Pharmacol* 80: 565-572.
108. Rong L, Perelson AS (2009) Modeling latently infected cell activation: viral and latent reservoir persistence, and viral blips in HIV-infected patients on potent therapy. *PLoS Comput Biol* 5: e1000533.

109. Perelson AS, Essunger P, Ho DD (1997) Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo. *AIDS* 11 Suppl A: S17-24.
110. Zhang L, Chung C, Hu BS, He T, Guo Y, et al. (2000) Genetic characterization of rebounding HIV-1 after cessation of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Invest* 106: 839-845.
111. Ramratnam B, Mittler JE, Zhang L, Boden D, Hurley A, et al. (2000) The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med* 6: 82-85.
112. Di Mascio M, Markowitz M, Louie M, Hogan C, Hurley A, et al. (2003) Viral blip dynamics during highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 77: 12165-12172.
113. Jones LE, Perelson AS (2007) Transient viremia, plasma viral load, and reservoir replenishment in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45: 483-493.
114. Nettles RE, Kieffer TL, Kwon P, Monie D, Han Y, et al. (2005) Intermittent HIV-1 viremia (Blips) and drug resistance in patients receiving HAART. *JAMA* 293: 817-829.
115. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, et al. (1994) Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 331: 1173-1180.
116. Minkoff H (2003) Human immunodeficiency virus infection in pregnancy. *Obstet Gynecol* 101: 797-810.
117. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, et al. (2011) Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 365: 493-505.
118. Gunthard HF, Saag MS, Benson CA, del Rio C, Eron JJ, et al. (2016) Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2016 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA* 316: 191-210.
119. Barre-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy JF (2013) Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol* 11: 877-883.
120. Dragic T, Trkola A, Thompson DA, Cormier EG, Kajumo FA, et al. (2000) A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5639-5644.
121. Arts EJ, Hazuda DJ (2012) HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a007161.
122. Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, et al. (2005) Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4721-4732.
123. Westby M, Lewis M, Whitcomb J, Youle M, Pozniak AL, et al. (2006) Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol* 80: 4909-4920.
124. Lalezari JP, Henry K, O'Hearn M, Montaner JS, Piliero PJ, et al. (2003) Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N Engl J Med* 348: 2175-2185.
125. Reeves JD, Lee FH, Miamidian JL, Jabara CB, Juntilla MM, et al. (2005) Enfuvirtide resistance mutations: impact on human immunodeficiency virus envelope function, entry inhibitor sensitivity, and virus neutralization. *J Virol* 79: 4991-4999.
126. Derdeyn CA, Decker JM, Sfakianos JN, Wu X, O'Brien WA, et al. (2000) Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J Virol* 74: 8358-8367.
127. Lalezari JP, Latiff GH, Brinson C, Echevarria J, Trevino-Perez S, et al. (2015) Safety and efficacy of the HIV-1 attachment inhibitor prodrug BMS-663068 in treatment-experienced individuals: 24 week results of AI438011, a phase 2b, randomised controlled trial. *Lancet HIV* 2: e427-437.

128. Balzarini J, Herdewijn P, De Clercq E (1989) Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J Biol Chem* 264: 6127-6133.
129. Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH (2001) Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* 75: 4832-4842.
130. Spence RA, Kati WM, Anderson KS, Johnson KA (1995) Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* 267: 988-993.
131. Hsiou Y, Ding J, Das K, Clark AD, Jr., Hughes SH, et al. (1996) Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. *Structure* 4: 853-860.
132. Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Boyer PL, et al. (1994) Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J Mol Biol* 243: 369-387.
133. Dykes C, Fox K, Lloyd A, Chiulli M, Morse E, et al. (2001) Impact of clinical reverse transcriptase sequences on the replication capacity of HIV-1 drug-resistant mutants. *Virology* 285: 193-203.
134. Kempf DJ, Marsh KC, Kumar G, Rodrigues AD, Denissen JF, et al. (1997) Pharmacokinetic enhancement of inhibitors of the human immunodeficiency virus protease by coadministration with ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 654-660.
135. Miron RE, Smith RJ (2014) Resistance to protease inhibitors in a model of HIV-1 infection with impulsive drug effects. *Bull Math Biol* 76: 59-97.
136. Molla A, Korneyeva M, Gao Q, Vasavanonda S, Schipper PJ, et al. (1996) Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nat Med* 2: 760-766.
137. Prabu-Jeyabalan M, Nalivaika E, Schiffer CA (2002) Substrate shape determines specificity of recognition for HIV-1 protease: analysis of crystal structures of six substrate complexes. *Structure* 10: 369-381.
138. Nalam MN, Ali A, Altman MD, Reddy GS, Chellappan S, et al. (2010) Evaluating the substrate-envelope hypothesis: structural analysis of novel HIV-1 protease inhibitors designed to be robust against drug resistance. *J Virol* 84: 5368-5378.
139. Nowicka-Sans B, Protack T, Lin Z, Li Z, Zhang S, et al. (2016) Identification and Characterization of BMS-955176, a Second-Generation HIV-1 Maturation Inhibitor with Improved Potency, Antiviral Spectrum, and Gag Polymorphic Coverage. *Antimicrob Agents Chemother* 60: 3956-3969.
140. Peeters M, D'Arc M, Delaporte E (2014) Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Rev* 16: 23-34.
141. Taylor BS, Hammer SM (2008) The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 359: 1965-1966.
142. Hue S, Gifford RJ, Dunn D, Fernhill E, Pillay D (2009) Demonstration of sustained drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 lineages circulating among treatment-naïve individuals. *J Virol* 83: 2645-2654.
143. Coffin JM (1995) HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267: 483-489.
144. Gunthard HF, Havlir DV, Fiscus S, Zhang ZQ, Eron J, et al. (2001) Residual human immunodeficiency virus (HIV) Type 1 RNA and DNA in lymph nodes and HIV RNA in genital secretions and in cerebrospinal fluid after suppression of viremia for 2 years. *J Infect Dis* 183: 1318-1327.
145. Smith DM, Wong JK, Shao H, Hightower GK, Mai SH, et al. (2007) Long-term persistence of transmitted HIV drug resistance in male genital tract secretions: implications for secondary transmission. *J Infect Dis* 196: 356-360.

146. Barber SA, Gama L, Dudaronek JM, Voelker T, Tarwater PM, et al. (2006) Mechanism for the establishment of transcriptional HIV latency in the brain in a simian immunodeficiency virus-macaque model. *J Infect Dis* 193: 963-970.
147. Blankson JN, Finzi D, Pierson TC, Sabundayo BP, Chadwick K, et al. (2000) Biphasic decay of latently infected CD4+ T cells in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 182: 1636-1642.
148. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, et al. (2003) Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 9: 727-728.
149. Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R (1990) Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* 249: 1555-1558.
150. Lesbats P, Engelman AN, Cherepanov P (2016) Retroviral DNA Integration. *Chem Rev*.
151. Pang S, Koyanagi Y, Miles S, Wiley C, Vinters HV, et al. (1990) High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients. *Nature* 343: 85-89.
152. Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM (1989) Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2525-2529.
153. Mizuuchi K, Adzuma K (1991) Inversion of the phosphate chirality at the target site of Mu DNA strand transfer: evidence for a one-step transesterification mechanism. *Cell* 66: 129-140.
154. Hare S, Gupta SS, Valkov E, Engelman A, Cherepanov P (2010) Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 464: 232-236.
155. Li Y, Kappes JC, Conway JA, Price RW, Shaw GM, et al. (1991) Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 cloned directly from uncultured human brain tissue: identification of replication-competent and -defective viral genomes. *J Virol* 65: 3973-3985.
156. Yan N, Cherepanov P, Daigle JE, Engelman A, Lieberman J (2009) The SET complex acts as a barrier to autointegration of HIV-1. *PLoS Pathog* 5: e1000327.
157. Maldarelli F, Wu X, Su L, Simonetti FR, Shao W, et al. (2014) HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* 345: 179-183.
158. Gerard A, Segeral E, Naughtin M, Abdouni A, Charmeteau B, et al. (2015) The integrase cofactor LEDGF/p75 associates with Iws1 and Spt6 for postintegration silencing of HIV-1 gene expression in latently infected cells. *Cell Host Microbe* 17: 107-117.
159. Serrao E, Ballandras-Colas A, Cherepanov P, Maertens GN, Engelman AN (2015) Key determinants of target DNA recognition by retroviral intasomes. *Retrovirology* 12: 39.
160. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM, Munroe DJ (2005) Weak palindromic consensus sequences are a common feature found at the integration target sites of many retroviruses. *J Virol* 79: 5211-5214.
161. Kvaratskhelia M, Sharma A, Larue RC, Serrao E, Engelman A (2014) Molecular mechanisms of retroviral integration site selection. *Nucleic Acids Res* 42: 10209-10225.
162. Sowd GA, Serrao E, Wang H, Wang W, Fadel HJ, et al. (2016) A critical role for alternative polyadenylation factor CPSF6 in targeting HIV-1 integration to transcriptionally active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E1054-1063.
163. Marini B, Kertesz-Farkas A, Ali H, Lucic B, Lisek K, et al. (2015) Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection. *Nature* 521: 227-231.
164. Engelman A, Mizuuchi K, Craigie R (1991) HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* 67: 1211-1221.
165. Bushman FD, Craigie R (1991) Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1339-1343.
166. Devroe E, Engelman A, Silver PA (2003) Intracellular transport of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Cell Sci* 116: 4401-4408.
167. Mulder LC, Chakrabarti LA, Muesing MA (2002) Interaction of HIV-1 integrase with DNA repair protein hRad18. *J Biol Chem* 277: 27489-27493.

168. Lloyd AG, Tateishi S, Bieniasz PD, Muesing MA, Yamaizumi M, et al. (2006) Effect of DNA repair protein Rad18 on viral infection. *PLoS Pathog* 2: e40.
169. Mousnier A, Kubat N, Massias-Simon A, Segéral E, Rain JC, et al. (2007) von Hippel Lindau binding protein 1-mediated degradation of integrase affects HIV-1 gene expression at a postintegration step. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13615-13620.
170. Yoder KE, Bushman FD (2000) Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates. *J Virol* 74: 11191-11200.
171. Yoder KE, Espeseth A, Wang XH, Fang Q, Russo MT, et al. (2011) The base excision repair pathway is required for efficient lentivirus integration. *PLoS One* 6: e17862.
172. Cooper A, Garcia M, Petrovas C, Yamamoto T, Koup RA, et al. (2013) HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration. *Nature* 498: 376-379.
173. Baekelandt V, Claeys A, Cherepanov P, De Clercq E, De Strooper B, et al. (2000) DNA-Dependent protein kinase is not required for efficient lentivirus integration. *J Virol* 74: 11278-11285.
174. Desfarges S, San Filippo J, Fournier M, Calmels C, Caumont-Sarcos A, et al. (2006) Chromosomal integration of LTR-flanked DNA in yeast expressing HIV-1 integrase: down regulation by RAD51. *Nucleic Acids Res* 34: 6215-6224.
175. Cosnefroy O, Tocco A, Lesbats P, Thierry S, Calmels C, et al. (2012) Stimulation of the human RAD51 nucleofilament restricts HIV-1 integration in vitro and in infected cells. *J Virol* 86: 513-526.
176. Thierry S, Benleulmi MS, Sinzelle L, Thierry E, Calmels C, et al. (2015) Dual and Opposite Effects of hRAD51 Chemical Modulation on HIV-1 Integration. *Chem Biol* 22: 712-723.
177. Chow SA, Vincent KA, Ellison V, Brown PO (1992) Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus. *Science* 255: 723-726.
178. Brussel A, Sonigo P (2003) Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus. *J Virol* 77: 10119-10124.
179. Sloan RD, Wainberg MA (2011) The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology* 8: 52.
180. Kilzer JM, Stracker T, Beitzel B, Meek K, Weitzman M, et al. (2003) Roles of host cell factors in circularization of retroviral dna. *Virology* 314: 460-467.
181. Munir S, Thierry S, Subra F, Deprez E, Delelis O (2013) Quantitative analysis of the time-course of viral DNA forms during the HIV-1 life cycle. *Retrovirology* 10: 87.
182. Li L, Olvera JM, Yoder KE, Mitchell RS, Butler SL, et al. (2001) Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *EMBO J* 20: 3272-3281.
183. Thierry S, Munir S, Thierry E, Subra F, Leh H, et al. (2015) Integrase inhibitor reversal dynamics indicate unintegrated HIV-1 dna initiate de novo integration. *Retrovirology* 12: 24.
184. Diamond TL, Bushman FD (2006) Role of metal ions in catalysis by HIV integrase analyzed using a quantitative PCR disintegration assay. *Nucleic Acids Res* 34: 6116-6125.
185. Delelis O, Parissi V, Leh H, Mbemba G, Petit C, et al. (2007) Efficient and specific internal cleavage of a retroviral palindromic DNA sequence by tetrameric HIV-1 integrase. *PLoS One* 2: e608.
186. Delelis O, Petit C, Leh H, Mbemba G, Mouscadet JF, et al. (2005) A novel function for spumaretrovirus integrase: an early requirement for integrase-mediated cleavage of 2 LTR circles. *Retrovirology* 2: 31.
187. Engelman A (1999) In vivo analysis of retroviral integrase structure and function. *Adv Virus Res* 52: 411-426.
188. Tekeste SS, Wilkinson TA, Weiner EM, Xu X, Miller JT, et al. (2015) Interaction between Reverse Transcriptase and Integrase Is Required for Reverse Transcription during HIV-1 Replication. *J Virol* 89: 12058-12069.
189. Engelman A, Cherepanov P (2008) The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog* 4: e1000046.

190. Demeulemeester J, De Rijck J, Gijssbers R, Debysers Z (2015) Retroviral integration: Site matters: Mechanisms and consequences of retroviral integration site selection. *Bioessays* 37: 1202-1214.
191. Cai M, Zheng R, Caffrey M, Craigie R, Clore GM, et al. (1997) Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. *Nat Struct Biol* 4: 567-577.
192. Esposito D, Craigie R (1999) HIV integrase structure and function. *Adv Virus Res* 52: 319-333.
193. Lee SP, Xiao J, Knutson JR, Lewis MS, Han MK (1997) Zn²⁺ promotes the self-association of human immunodeficiency virus type-1 integrase in vitro. *Biochemistry* 36: 173-180.
194. Heuer TS, Brown PO (1997) Mapping features of HIV-1 integrase near selected sites on viral and target DNA molecules in an active enzyme-DNA complex by photo-cross-linking. *Biochemistry* 36: 10655-10665.
195. Masuda T, Planelles V, Krogstad P, Chen IS (1995) Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the U3 att site: unusual phenotype of mutants in the zinc finger-like domain. *J Virol* 69: 6687-6696.
196. Ballandras-Colas A, Naraharisetty H, Li X, Serrao E, Engelman A (2013) Biochemical characterization of novel retroviral integrase proteins. *PLoS One* 8: e76638.
197. Kulkosky J, Jones KS, Katz RA, Mack JP, Skalka AM (1992) Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol Cell Biol* 12: 2331-2338.
198. Yang W, Lee JY, Nowotny M (2006) Making and breaking nucleic acids: two-Mg²⁺-ion catalysis and substrate specificity. *Mol Cell* 22: 5-13.
199. Dyda F, Hickman AB, Jenkins TM, Engelman A, Craigie R, et al. (1994) Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science* 266: 1981-1986.
200. Nowotny M (2009) Retroviral integrase superfamily: the structural perspective. *EMBO Rep* 10: 144-151.
201. Lins RD, Adesokan A, Soares TA, Briggs JM (2000) Investigations on human immunodeficiency virus type 1 integrase/DNA binding interactions via molecular dynamics and electrostatics calculations. *Pharmacol Ther* 85: 123-131.
202. Esposito D, Craigie R (1998) Sequence specificity of viral end DNA binding by HIV-1 integrase reveals critical regions for protein-DNA interaction. *EMBO J* 17: 5832-5843.
203. Lee MC, Deng J, Briggs JM, Duan Y (2005) Large-scale conformational dynamics of the HIV-1 integrase core domain and its catalytic loop mutants. *Biophys J* 88: 3133-3146.
204. Jenkins TM, Esposito D, Engelman A, Craigie R (1997) Critical contacts between HIV-1 integrase and viral DNA identified by structure-based analysis and photo-crosslinking. *EMBO J* 16: 6849-6859.
205. Eijkelenboom AP, Lutzke RA, Boelens R, Plasterk RH, Kaptein R, et al. (1995) The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold. *Nat Struct Biol* 2: 807-810.
206. Woerner AM, Marcus-Sekura CJ (1993) Characterization of a DNA binding domain in the C-terminus of HIV-1 integrase by deletion mutagenesis. *Nucleic Acids Res* 21: 3507-3511.
207. Kalpana GV, Reicin A, Cheng GS, Sorin M, Paik S, et al. (1999) Isolation and characterization of an oligomerization-negative mutant of HIV-1 integrase. *Virology* 259: 274-285.
208. Maertens GN, Hare S, Cherepanov P (2010) The mechanism of retroviral integration from X-ray structures of its key intermediates. *Nature* 468: 326-329.
209. Briggs JA, Simon MN, Gross I, Krausslich HG, Fuller SD, et al. (2004) The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* 11: 672-675.
210. Calmels C, de Soultrait VR, Caumont A, Desjobert C, Faure A, et al. (2004) Biochemical and random mutagenesis analysis of the region carrying the catalytic E152 amino acid of HIV-1 integrase. *Nucleic Acids Res* 32: 1527-1538.

211. Cherepanov P, Maertens G, Proost P, Devreese B, Van Beeumen J, et al. (2003) HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem* 278: 372-381.
212. Deprez E, Tauc P, Leh H, Mouscadet JF, Auclair C, et al. (2000) Oligomeric states of the HIV-1 integrase as measured by time-resolved fluorescence anisotropy. *Biochemistry* 39: 9275-9284.
213. Deprez E, Tauc P, Leh H, Mouscadet JF, Auclair C, et al. (2001) DNA binding induces dissociation of the multimeric form of HIV-1 integrase: a time-resolved fluorescence anisotropy study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10090-10095.
214. Wang JY, Ling H, Yang W, Craigie R (2001) Structure of a two-domain fragment of HIV-1 integrase: implications for domain organization in the intact protein. *EMBO J* 20: 7333-7343.
215. Faure A, Calmels C, Desjobert C, Castroviejo M, Caumont-Sarcos A, et al. (2005) HIV-1 integrase crosslinked oligomers are active in vitro. *Nucleic Acids Res* 33: 977-986.
216. Bera S, Pandey KK, Vora AC, Grandgenett DP (2009) Molecular Interactions between HIV-1 integrase and the two viral DNA ends within the synaptic complex that mediates concerted integration. *J Mol Biol* 389: 183-198.
217. Krishnan L, Engelman A (2012) Retroviral integrase proteins and HIV-1 DNA integration. *J Biol Chem* 287: 40858-40866.
218. Li M, Lin S, Craigie R (2016) Outer domains of integrase within retroviral intasomes are dispensible for catalysis of DNA integration. *Protein Sci* 25: 472-478.
219. Hare S, Maertens GN, Cherepanov P (2012) 3'-processing and strand transfer catalysed by retroviral integrase in crystallo. *EMBO J* 31: 3020-3028.
220. Benleulmi MS, Matysiak J, Henriquez DR, Vaillant C, Lesbats P, et al. (2015) Intasome architecture and chromatin density modulate retroviral integration into nucleosome. *Retrovirology* 12: 13.
221. Maskell DP, Renault L, Serrao E, Lesbats P, Matadeen R, et al. (2015) Structural basis for retroviral integration into nucleosomes. *Nature* 523: 366-369.
222. Johnson BC, Metifiot M, Ferris A, Pommier Y, Hughes SH (2013) A homology model of HIV-1 integrase and analysis of mutations designed to test the model. *J Mol Biol* 425: 2133-2146.
223. Yin Z, Shi K, Banerjee S, Pandey KK, Bera S, et al. (2016) Crystal structure of the Rous sarcoma virus intasome. *Nature* 530: 362-366.
224. Ballandras-Colas A, Brown M, Cook NJ, Dewdney TG, Demeler B, et al. (2016) Cryo-EM reveals a novel octameric integrase structure for betaretroviral intasome function. *Nature* 530: 358-361.
225. Shin CG, Taddeo B, Haseltine WA, Farnet CM (1994) Genetic analysis of the human immunodeficiency virus type 1 integrase protein. *J Virol* 68: 1633-1642.
226. Leavitt AD, Robles G, Alesandro N, Varmus HE (1996) Human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants retain in vitro integrase activity yet fail to integrate viral DNA efficiently during infection. *J Virol* 70: 721-728.
227. Wu X, Liu H, Xiao H, Conway JA, Hehl E, et al. (1999) Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. *J Virol* 73: 2126-2135.
228. Herschhorn A, Oz-Gleenberg I, Hizi A (2008) Quantitative analysis of the interactions between HIV-1 integrase and retroviral reverse transcriptases. *Biochem J* 412: 163-170.
229. Oz I, Avidan O, Hizi A (2002) Inhibition of the integrases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2 by reverse transcriptases. *Biochem J* 361: 557-566.
230. Hehl EA, Joshi P, Kalpana GV, Prasad VR (2004) Interaction between human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase proteins. *J Virol* 78: 5056-5067.
231. Gao K, Gorelick RJ, Johnson DG, Bushman F (2003) Cofactors for human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration in vitro. *J Virol* 77: 1598-1603.
232. Farnet CM, Haseltine WA (1990) Integration of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4164-4168.

233. Farnet CM, Bushman FD (1997) HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro. *Cell* 88: 483-492.
234. Lee MS, Craigie R (1994) Protection of retroviral DNA from autointegration: involvement of a cellular factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9823-9827.
235. Kalpana GV, Marmon S, Wang W, Crabtree GR, Goff SP (1994) Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science* 266: 2002-2006.
236. Emiliani S, Mousnier A, Busschots K, Maroun M, Van Maele B, et al. (2005) Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication. *J Biol Chem* 280: 25517-25523.
237. Lin CW, Engelman A (2003) The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *J Virol* 77: 5030-5036.
238. Reeves R, Beckerbauer L (2001) HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta* 1519: 13-29.
239. Hindmarsh P, Ridky T, Reeves R, Andrade M, Skalka AM, et al. (1999) HMG protein family members stimulate human immunodeficiency virus type 1 and avian sarcoma virus concerted DNA integration in vitro. *J Virol* 73: 2994-3003.
240. Li L, Yoder K, Hansen MS, Olvera J, Miller MD, et al. (2000) Retroviral cDNA integration: stimulation by HMG I family proteins. *J Virol* 74: 10965-10974.
241. Van Lint C, Emiliani S, Ott M, Verdin E (1996) Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J* 15: 1112-1120.
242. Henderson A, Bunce M, Siddon N, Reeves R, Tremethick DJ (2000) High-mobility-group protein I can modulate binding of transcription factors to the U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 proviral promoter. *J Virol* 74: 10523-10534.
243. Henderson A, Holloway A, Reeves R, Tremethick DJ (2004) Recruitment of SWI/SNF to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol* 24: 389-397.
244. Zheng R, Ghirlando R, Lee MS, Mizuuchi K, Krause M, et al. (2000) Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8997-9002.
245. Furukawa K (1999) LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J Cell Sci* 112 (Pt 15): 2485-2492.
246. Turlure F, Devroe E, Silver PA, Engelman A (2004) Human cell proteins and human immunodeficiency virus DNA integration. *Front Biosci* 9: 3187-3208.
247. Mansharamani M, Graham DR, Monie D, Lee KK, Hildreth JE, et al. (2003) Barrier-to-autointegration factor BAF binds p55 Gag and matrix and is a host component of human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* 77: 13084-13092.
248. Wang W, Cote J, Xue Y, Zhou S, Khavari PA, et al. (1996) Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J* 15: 5370-5382.
249. Maroun M, Delelis O, Coadou G, Bader T, Segeral E, et al. (2006) Inhibition of early steps of HIV-1 replication by SNF5/Ini1. *J Biol Chem* 281: 22736-22743.
250. Yung E, Sorin M, Pal A, Craig E, Morozov A, et al. (2001) Inhibition of HIV-1 virion production by a transdominant mutant of integrase interactor 1. *Nat Med* 7: 920-926.
251. Lesbats P, Botbol Y, Chevereau G, Vaillant C, Calmels C, et al. (2011) Functional coupling between HIV-1 integrase and the SWI/SNF chromatin remodeling complex for efficient in vitro integration into stable nucleosomes. *PLoS Pathog* 7: e1001280.
252. Van Maele B, Busschots K, Vandekerckhove L, Christ F, Debyser Z (2006) Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends Biochem Sci* 31: 98-105.
253. Christ F, Thys W, De Rijck J, Gijssels R, Albanese A, et al. (2008) Transportin-SR2 imports HIV into the nucleus. *Curr Biol* 18: 1192-1202.
254. Lai MC, Lin RI, Huang SY, Tsai CW, Tarn WY (2000) A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J Biol Chem* 275: 7950-7957.

255. Kataoka N, Bachorik JL, Dreyfuss G (1999) Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J Cell Biol* 145: 1145-1152.
256. Yun CY, Velazquez-Dones AL, Lyman SK, Fu XD (2003) Phosphorylation-dependent and -independent nuclear import of RS domain-containing splicing factors and regulators. *J Biol Chem* 278: 18050-18055.
257. Ali MK, Kim J, Hamid FB, Shin CG (2015) Knockdown of the host cellular protein transportin 3 attenuates prototype foamy virus infection. *Biosci Biotechnol Biochem* 79: 943-951.
258. Shah VB, Shi J, Hout DR, Oztop I, Krishnan L, et al. (2013) The host proteins transportin SR2/TNPO3 and cyclophilin A exert opposing effects on HIV-1 uncoating. *J Virol* 87: 422-432.
259. Ocwieja KE, Brady TL, Ronen K, Huegel A, Roth SL, et al. (2011) HIV integration targeting: a pathway involving Transportin-3 and the nuclear pore protein RanBP2. *PLoS Pathog* 7: e1001313.
260. Violot S, Hong SS, Rakotobe D, Petit C, Gay B, et al. (2003) The human polycomb group EED protein interacts with the integrase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 77: 12507-12522.
261. Parissi V, Caumont A, Richard de Soultrait V, Dupont CH, Pichuantes S, et al. (2000) Inactivation of the SNF5 transcription factor gene abolishes the lethal phenotype induced by the expression of HIV-1 integrase in yeast. *Gene* 247: 129-136.
262. Cereseto A, Manganaro L, Gutierrez MI, Terreni M, Fittipaldi A, et al. (2005) Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration. *EMBO J* 24: 3070-3081.
263. Emiliani StrFP, 75019 Paris, FR), Berlioz-torrent, Clarisse (54 Boulevard Exelmans, 75016 Paris, FR), Benarous, Richard (19 rue Croulebarbe, 75013 Paris, FR), Paris, Jean-marc (8 rue des Acacias, 77360 Vaires sur Marne, FR), Berrut, Sébastien (21 rue René Leynaud, 69001 Lyon, FR), Barbey, Sabine (4 place des Quatre Vents, 91400 Saclay, FR), (2010) Novel substituted aryl derivatives, their process of preparation and their therapeutical uses as anti-HIV agents. Cellvir (4, rue Pierre Fontaine Pépinière Génopole Entreprises, 91000 Evry, FR), INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (101, rue de Tolbiac, 75013 Paris, FR), CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (3, rue Michel Ange, 75016 Paris, FR),.
264. Devroe ESAS, Boston, MA, 02120, US), Engelman, Alan (17 Stearns Road, Apt. 64 Brookline, MA, 02446, US), Silver, Pamela (108 Fayerweather Street, No. 2 Cambridge, MA, 02138, US) (2004) NDR KINASE MODULATORS. DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. (44 Binney Street, Boston, MA, 02115, US), Devroe, Eric (75 Saint Alphonsus Street #2004, Boston, MA, 02120, US), Engelman, Alan (17 Stearns Road, Apt. 64 Brookline, MA, 02446, US), Silver, Pamela (108 Fayerweather Street, No. 2 Cambridge, MA, 02138, US).
265. Nishizawa Y, Usukura J, Singh DP, Chylack LT, Jr., Shinohara T (2001) Spatial and temporal dynamics of two alternatively spliced regulatory factors, lens epithelium-derived growth factor (ledgf/p75) and p52, in the nucleus. *Cell Tissue Res* 305: 107-114.
266. Ge H, Si Y, Roeder RG (1998) Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *EMBO J* 17: 6723-6729.
267. Singh DP, Kimura A, Chylack LT, Jr., Shinohara T (2000) Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75) and p52 are derived from a single gene by alternative splicing. *Gene* 242: 265-273.
268. Cherepanov P, Devroe E, Silver PA, Engelman A (2004) Identification of an evolutionarily conserved domain in human lens epithelium-derived growth factor/transcriptional co-activator p75 (LEDGF/p75) that binds HIV-1 integrase. *J Biol Chem* 279: 48883-48892.
269. Maertens G, Cherepanov P, Debyser Z, Engelborghs Y, Engelman A (2004) Identification and characterization of a functional nuclear localization signal in the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75. *J Biol Chem* 279: 33421-33429.

270. Turlure F, Maertens G, Rahman S, Cherepanov P, Engelman A (2006) A tripartite DNA-binding element, comprised of the nuclear localization signal and two AT-hook motifs, mediates the association of LEDGF/p75 with chromatin in vivo. *Nucleic Acids Res* 34: 1653-1665.
271. Llano M, Vanegas M, Hutchins N, Thompson D, Delgado S, et al. (2006) Identification and characterization of the chromatin-binding domains of the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75. *J Mol Biol* 360: 760-773.
272. van Nuland R, van Schaik FM, Simonis M, van Heesch S, Cuppen E, et al. (2013) Nucleosomal DNA binding drives the recognition of H3K36-methylated nucleosomes by the PSIP1-PWWP domain. *Epigenetics Chromatin* 6: 12.
273. Maertens G, Cherepanov P, Pluymers W, Busschots K, De Clercq E, et al. (2003) LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem* 278: 33528-33539.
274. Maertens GN, Cherepanov P, Engelman A (2006) Transcriptional co-activator p75 binds and tethers the Myc-interacting protein JPO2 to chromatin. *J Cell Sci* 119: 2563-2571.
275. Bartholomeeusen K, De Rijck J, Busschots K, Desender L, Gijssbers R, et al. (2007) Differential interaction of HIV-1 integrase and JPO2 with the C terminus of LEDGF/p75. *J Mol Biol* 372: 407-421.
276. Yokoyama A, Cleary ML (2008) Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer Cell* 14: 36-46.
277. Hughes S, Jenkins V, Dar MJ, Engelman A, Cherepanov P (2010) Transcriptional co-activator LEDGF interacts with Cdc7-activator of S-phase kinase (ASK) and stimulates its enzymatic activity. *J Biol Chem* 285: 541-554.
278. Vandegraaff N, Devroe E, Turlure F, Silver PA, Engelman A (2006) Biochemical and genetic analyses of integrase-interacting proteins lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)/p75 and hepatoma-derived growth factor related protein 2 (HRP2) in preintegration complex function and HIV-1 replication. *Virology* 346: 415-426.
279. Wang H, Jurado KA, Wu X, Shun MC, Li X, et al. (2012) HRP2 determines the efficiency and specificity of HIV-1 integration in LEDGF/p75 knockout cells but does not contribute to the antiviral activity of a potent LEDGF/p75-binding site integrase inhibitor. *Nucleic Acids Res* 40: 11518-11530.
280. Busschots K, Vercammen J, Emiliani S, Benarous R, Engelborghs Y, et al. (2005) The interaction of LEDGF/p75 with integrase is lentivirus-specific and promotes DNA binding. *J Biol Chem* 280: 17841-17847.
281. Llano M, Saenz DT, Meehan A, Wongthida P, Peretz M, et al. (2006) An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science* 314: 461-464.
282. Poeschla EM (2008) Integrase, LEDGF/p75 and HIV replication. *Cell Mol Life Sci* 65: 1403-1424.
283. Shun MC, Raghavendra NK, Vandegraaff N, Daigle JE, Hughes S, et al. (2007) LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes Dev* 21: 1767-1778.
284. Vandekerckhove L, Christ F, Van Maele B, De Rijck J, Gijssbers R, et al. (2006) Transient and stable knockdown of the integrase cofactor LEDGF/p75 reveals its role in the replication cycle of human immunodeficiency virus. *J Virol* 80: 1886-1896.
285. De Rijck J, Vandekerckhove L, Gijssbers R, Hombrouck A, Hendrix J, et al. (2006) Overexpression of the lens epithelium-derived growth factor/p75 integrase binding domain inhibits human immunodeficiency virus replication. *J Virol* 80: 11498-11509.
286. Hare S, Cherepanov P (2009) The Interaction Between Lentiviral Integrase and LEDGF: Structural and Functional Insights. *Viruses* 1: 780-801.
287. Llano M, Delgado S, Vanegas M, Poeschla EM (2004) Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase. *J Biol Chem* 279: 55570-55577.
288. Llano M, Vanegas M, Fregoso O, Saenz D, Chung S, et al. (2004) LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *J Virol* 78: 9524-9537.

289. Hare S, Shun MC, Gupta SS, Valkov E, Engelman A, et al. (2009) A novel co-crystal structure affords the design of gain-of-function lentiviral integrase mutants in the presence of modified PSIP1/LEDGF/p75. *PLoS Pathog* 5: e1000259.
290. Michel F, Crucifix C, Granger F, Eiler S, Mouscadet JF, et al. (2009) Structural basis for HIV-1 DNA integration in the human genome, role of the LEDGF/P75 cofactor. *EMBO J* 28: 980-991.
291. Cherepanov P, Sun ZY, Rahman S, Maertens G, Wagner G, et al. (2005) Solution structure of the HIV-1 integrase-binding domain in LEDGF/p75. *Nat Struct Mol Biol* 12: 526-532.
292. Cherepanov P, Ambrosio AL, Rahman S, Ellenberger T, Engelman A (2005) Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17308-17313.
293. Hare S, Di Nunzio F, Labeja A, Wang J, Engelman A, et al. (2009) Structural basis for functional tetramerization of lentiviral integrase. *PLoS Pathog* 5: e1000515.
294. Christ F, Debyser Z (2013) The LEDGF/p75 integrase interaction, a novel target for anti-HIV therapy. *Virology* 435: 102-109.
295. McKee CJ, Kessl JJ, Shkriabai N, Dar MJ, Engelman A, et al. (2008) Dynamic modulation of HIV-1 integrase structure and function by cellular lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) protein. *J Biol Chem* 283: 31802-31812.
296. Hayouka Z, Rosenbluh J, Levin A, Loya S, Lebendiker M, et al. (2007) Inhibiting HIV-1 integrase by shifting its oligomerization equilibrium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 8316-8321.
297. Kessl JJ, Li M, Ignatov M, Shkriabai N, Eidahl JO, et al. (2011) FRET analysis reveals distinct conformations of IN tetramers in the presence of viral DNA or LEDGF/p75. *Nucleic Acids Res* 39: 9009-9022.
298. Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, Wolfe A, Stillmock K, et al. (2000) Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 287: 646-650.
299. Hazuda DJ, Hastings JC, Wolfe AL, Emini EA (1994) A novel assay for the DNA strand-transfer reaction of HIV-1 integrase. *Nucleic Acids Res* 22: 1121-1122.
300. Murray JM, Emery S, Kelleher AD, Law M, Chen J, et al. (2007) Antiretroviral therapy with the integrase inhibitor raltegravir alters decay kinetics of HIV, significantly reducing the second phase. *AIDS* 21: 2315-2321.
301. Summa V, Petrocchi A, Bonelli F, Crescenzi B, Donghi M, et al. (2008) Discovery of raltegravir, a potent, selective orally bioavailable HIV-integrase inhibitor for the treatment of HIV-AIDS infection. *J Med Chem* 51: 5843-5855.
302. Sato M, Motomura T, Aramaki H, Matsuda T, Yamashita M, et al. (2006) Novel HIV-1 integrase inhibitors derived from quinolone antibiotics. *J Med Chem* 49: 1506-1508.
303. Johns BA, Kawasuji T, Weatherhead JG, Taishi T, Temelkoff DP, et al. (2013) Carbamoyl pyridone HIV-1 integrase inhibitors 3. A diastereomeric approach to chiral nonracemic tricyclic ring systems and the discovery of dolutegravir (S/GSK1349572) and (S/GSK1265744). *J Med Chem* 56: 5901-5916.
304. Grobler JA, Hazuda DJ (2014) Resistance to HIV integrase strand transfer inhibitors: in vitro findings and clinical consequences. *Curr Opin Virol* 8: 98-103.
305. Hightower KE, Wang R, Deanda F, Johns BA, Weaver K, et al. (2011) Dolutegravir (S/GSK1349572) exhibits significantly slower dissociation than raltegravir and elvitegravir from wild-type and integrase inhibitor-resistant HIV-1 integrase-DNA complexes. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 4552-4559.
306. Grobler JA, Stillmock K, Hu B, Witmer M, Felock P, et al. (2002) Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6661-6666.
307. Damond F, Lariven S, Roquebert B, Males S, Peytavin G, et al. (2008) Virological and immunological response to HAART regimen containing integrase inhibitors in HIV-2-infected patients. *AIDS* 22: 665-666.

308. Garrido C, Geretti AM, Zahonero N, Booth C, Strang A, et al. (2010) Integrase variability and susceptibility to HIV integrase inhibitors: impact of subtypes, antiretroviral experience and duration of HIV infection. *J Antimicrob Chemother* 65: 320-326.
309. Lewis MG, Norelli S, Collins M, Barreca ML, Iraci N, et al. (2010) Response of a simian immunodeficiency virus (SIVmac251) to raltegravir: a basis for a new treatment for simian AIDS and an animal model for studying lentiviral persistence during antiretroviral therapy. *Retrovirology* 7: 21.
310. Koh Y, Matreyek KA, Engelman A (2011) Differential sensitivities of retroviruses to integrase strand transfer inhibitors. *J Virol* 85: 3677-3682.
311. Hare S, Vos AM, Clayton RF, Thuring JW, Cummings MD, et al. (2010) Molecular mechanisms of retroviral integrase inhibition and the evolution of viral resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20057-20062.
312. Delaugerre C, Valantin MA, Mouroux M, Bonmarchand M, Carcelain G, et al. (2001) Re-occurrence of HIV-1 drug mutations after treatment re-initiation following interruption in patients with multiple treatment failure. *AIDS* 15: 2189-2191.
313. Land S, McGavin K, Birch C, Lucas R (1991) Reversion from zidovudine resistance to sensitivity on cessation of treatment. *Lancet* 338: 830-831.
314. Wainberg MA, Zaharatos GJ, Brenner BG (2011) Development of antiretroviral drug resistance. *N Engl J Med* 365: 637-646.
315. Markowitz M, Nguyen BY, Gotuzzo E, Mendo F, Ratanasuwan W, et al. (2009) Sustained antiretroviral effect of raltegravir after 96 weeks of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52: 350-356.
316. Markowitz M, Nguyen BY, Gotuzzo E, Mendo F, Ratanasuwan W, et al. (2007) Rapid and durable antiretroviral effect of the HIV-1 Integrase inhibitor raltegravir as part of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection: results of a 48-week controlled study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 46: 125-133.
317. Rockstroh JK, DeJesus E, Lennox JL, Yazdanpanah Y, Saag MS, et al. (2013) Durable efficacy and safety of raltegravir versus efavirenz when combined with tenofovir/emtricitabine in treatment-naive HIV-1-infected patients: final 5-year results from STARTMRK. *J Acquir Immune Defic Syndr* 63: 77-85.
318. Raffi F, Babiker AG, Richert L, Molina JM, George EC, et al. (2014) Ritonavir-boosted darunavir combined with raltegravir or tenofovir-emtricitabine in antiretroviral-naive adults infected with HIV-1: 96 week results from the NEAT001/ANRS143 randomised non-inferiority trial. *Lancet* 384: 1942-1951.
319. Ghosn J, Mazet AA, Avettand-Fenoel V, Peytavin G, Wirden M, et al. (2009) Rapid selection and archiving of mutation E157Q in HIV-1 DNA during short-term low-level replication on a raltegravir-containing regimen. *J Antimicrob Chemother* 64: 433-434.
320. Cooper DA, Steigbigel RT, Gatell JM, Rockstroh JK, Katlama C, et al. (2008) Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. *N Engl J Med* 359: 355-365.
321. Delelis O, Malet I, Na L, Tchertanov L, Calvez V, et al. (2009) The G140S mutation in HIV integrases from raltegravir-resistant patients rescues catalytic defect due to the resistance Q148H mutation. *Nucleic Acids Res* 37: 1193-1201.
322. Mesplede T, Wainberg MA (2015) Resistance against Integrase Strand Transfer Inhibitors and Relevance to HIV Persistence. *Viruses* 7: 3703-3718.
323. Mouscadet JF, Delelis O, Marcelin AG, Tchertanov L (2010) Resistance to HIV-1 integrase inhibitors: A structural perspective. *Drug Resist Updat* 13: 139-150.
324. Raffi F, Jaeger H, Quiros-Roldan E, Albrecht H, Belonosova E, et al. (2013) Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naive adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis* 13: 927-935.

325. Raffi F, Rachlis A, Stellbrink HJ, Hardy WD, Torti C, et al. (2013) Once-daily dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-naive adults with HIV-1 infection: 48 week results from the randomised, double-blind, non-inferiority SPRING-2 study. *Lancet* 381: 735-743.
326. Cahn P, Pozniak AL, Mingrone H, Shuldyakov A, Brites C, et al. (2013) Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naive adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. *Lancet* 382: 700-708.
327. Oliveira M, Mesplede T, Quashie PK, Moisi D, Wainberg MA (2014) Resistance mutations against dolutegravir in HIV integrase impair the emergence of resistance against reverse transcriptase inhibitors. *AIDS* 28: 813-819.
328. Quashie PK, Mesplede T, Han YS, Oliveira M, Singhroy DN, et al. (2012) Characterization of the R263K mutation in HIV-1 integrase that confers low-level resistance to the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir. *J Virol* 86: 2696-2705.
329. Mesplede T, Quashie PK, Osman N, Han Y, Singhroy DN, et al. (2013) Viral fitness cost prevents HIV-1 from evading dolutegravir drug pressure. *Retrovirology* 10: 22.
330. Eron JJ, Clotet B, Durant J, Katlama C, Kumar P, et al. (2013) Safety and efficacy of dolutegravir in treatment-experienced subjects with raltegravir-resistant HIV type 1 infection: 24-week results of the VIKING Study. *J Infect Dis* 207: 740-748.
331. Castagna A, Maggiolo F, Penco G, Wright D, Mills A, et al. (2014) Dolutegravir in antiretroviral-experienced patients with raltegravir- and/or elvitegravir-resistant HIV-1: 24-week results of the phase III VIKING-3 study. *J Infect Dis* 210: 354-362.
332. Akil B, Blick G, Hagins DP, Ramgopal MN, Richmond GJ, et al. (2015) Dolutegravir versus placebo in subjects harbouring HIV-1 with integrase inhibitor resistance associated substitutions: 48-week results from VIKING-4, a randomized study. *Antivir Ther* 20: 343-348.
333. Canducci F, Ceresola ER, Boeri E, Spagnuolo V, Cossarini F, et al. (2011) Cross-resistance profile of the novel integrase inhibitor Dolutegravir (S/GSK1349572) using clonal viral variants selected in patients failing raltegravir. *J Infect Dis* 204: 1811-1815.
334. Goethals O, Vos A, Van Ginderen M, Geluykens P, Smits V, et al. (2010) Primary mutations selected in vitro with raltegravir confer large fold changes in susceptibility to first-generation integrase inhibitors, but minor fold changes to inhibitors with second-generation resistance profiles. *Virology* 402: 338-346.
335. Wells JA, McClendon CL (2007) Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* 450: 1001-1009.
336. Molteni V, Greenwald J, Rhodes D, Hwang Y, Kwiatkowski W, et al. (2001) Identification of a small-molecule binding site at the dimer interface of the HIV integrase catalytic domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 536-544.
337. Jurado KA, Engelman A (2013) Multimodal mechanism of action of allosteric HIV-1 integrase inhibitors. *Expert Rev Mol Med* 15: e14.
338. Al-Mawsawi LQ, Christ F, Dayam R, Debyser Z, Neamati N (2008) Inhibitory profile of a LEDGF/p75 peptide against HIV-1 integrase: insight into integrase-DNA complex formation and catalysis. *FEBS Lett* 582: 1425-1430.
339. Tsiang M, Jones GS, Niedziela-Majka A, Kan E, Lansdon EB, et al. (2012) New class of HIV-1 integrase (IN) inhibitors with a dual mode of action. *J Biol Chem* 287: 21189-21203.
340. Christ F, Voet A, Marchand A, Nicolet S, Desimmie BA, et al. (2010) Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication. *Nat Chem Biol* 6: 442-448.
341. Christ F, Shaw S, Demeulemeester J, Desimmie BA, Marchand A, et al. (2012) Small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75 binding site of integrase block HIV replication and modulate integrase multimerization. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 4365-4374.
342. Kessl JJ, Jena N, Koh Y, Taskent-Sezgin H, Slaughter A, et al. (2012) Multimode, cooperative mechanism of action of allosteric HIV-1 integrase inhibitors. *J Biol Chem* 287: 16801-16811.

343. Balakrishnan M, Yant SR, Tsai L, O'Sullivan C, Bam RA, et al. (2013) Non-catalytic site HIV-1 integrase inhibitors disrupt core maturation and induce a reverse transcription block in target cells. *PLoS One* 8: e74163.
344. Jurado KA, Wang H, Slaughter A, Feng L, Kessl JJ, et al. (2013) Allosteric integrase inhibitor potency is determined through the inhibition of HIV-1 particle maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 8690-8695.
345. Sharma A, Slaughter A, Jena N, Feng L, Kessl JJ, et al. (2014) A new class of multimerization selective inhibitors of HIV-1 integrase. *PLoS Pathog* 10: e1004171.
346. Kessl JJ, Eidahl JO, Shkriabai N, Zhao Z, McKee CJ, et al. (2009) An allosteric mechanism for inhibiting HIV-1 integrase with a small molecule. *Mol Pharmacol* 76: 824-832.
347. Maroun RG, Gayet S, Benleulmi MS, Porumb H, Zargarian L, et al. (2001) Peptide inhibitors of HIV-1 integrase dissociate the enzyme oligomers. *Biochemistry* 40: 13840-13848.
348. Tintori C, Demeulemeester J, Franchi L, Massa S, Debyser Z, et al. (2012) Discovery of small molecule HIV-1 integrase dimerization inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 3109-3114.
349. Fader LD, Malenfant E, Parisien M, Carson R, Bilodeau F, et al. (2014) Discovery of BI 224436, a Noncatalytic Site Integrase Inhibitor (NCINI) of HIV-1. *ACS Med Chem Lett* 5: 422-427.
350. Le Rouzic E, Bonnard D, Chasset S, Bruneau JM, Chevreuril F, et al. (2013) Dual inhibition of HIV-1 replication by integrase-LEDGF allosteric inhibitors is predominant at the post-integration stage. *Retrovirology* 10: 144.
351. Rahman S, Lu R, Vandegraaff N, Cherepanov P, Engelman A (2007) Structure-based mutagenesis of the integrase-LEDGF/p75 interface uncouples a strict correlation between in vitro protein binding and HIV-1 fitness. *Virology* 357: 79-90.
352. Desimmie BA, Schrijvers R, Demeulemeester J, Borrenberghs D, Weydert C, et al. (2013) LEDGINS inhibit late stage HIV-1 replication by modulating integrase multimerization in the virions. *Retrovirology* 10: 57.
353. Shehu-Xhilaga M, Hill M, Marshall JA, Kappes J, Crowe SM, et al. (2002) The conformation of the mature dimeric human immunodeficiency virus type 1 RNA genome requires packaging of pol protein. *J Virol* 76: 4331-4340.
354. Fontana J, Jurado KA, Cheng N, Ly NL, Fuchs JR, et al. (2015) Distribution and Redistribution of HIV-1 Nucleocapsid Protein in Immature, Mature, and Integrase-Inhibited Virions: a Role for Integrase in Maturation. *J Virol* 89: 9765-9780.
355. van Bel N, van der Velden Y, Bonnard D, Le Rouzic E, Das AT, et al. (2014) The allosteric HIV-1 integrase inhibitor BI-D affects virion maturation but does not influence packaging of a functional RNA genome. *PLoS One* 9: e103552.
356. Schrijvers R, De Rijck J, Demeulemeester J, Adachi N, Vets S, et al. (2012) LEDGF/p75-independent HIV-1 replication demonstrates a role for HRP-2 and remains sensitive to inhibition by LEDGINS. *PLoS Pathog* 8: e1002558.
357. Fadel HJ, Morrison JH, Saenz DT, Fuchs JR, Kvaratskhelia M, et al. (2014) TALEN knockout of the PSIP1 gene in human cells: analyses of HIV-1 replication and allosteric integrase inhibitor mechanism. *J Virol* 88: 9704-9717.
358. Feng L, Dharmarajan V, Serrao E, Hoyte A, Larue RC, et al. (2016) The Competitive Interplay between Allosteric HIV-1 Integrase Inhibitor BI/D and LEDGF/p75 during the Early Stage of HIV-1 Replication Adversely Affects Inhibitor Potency. *ACS Chem Biol* 11: 1313-1321.
359. Fenwick C, Amad M, Bailey MD, Bethell R, Bos M, et al. (2014) Preclinical profile of BI 224436, a novel HIV-1 non-catalytic-site integrase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 3233-3244.
360. Feng L, Sharma A, Slaughter A, Jena N, Koh Y, et al. (2013) The A128T resistance mutation reveals aberrant protein multimerization as the primary mechanism of action of allosteric HIV-1 integrase inhibitors. *J Biol Chem* 288: 15813-15820.
361. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM (2000) AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287: 607-614.

362. Locatelli S, Peeters M (2012) Cross-species transmission of simian retroviruses: how and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population. *AIDS* 26: 659-673.
363. Daniel MD, Letvin NL, King NW, Kannagi M, Sehgal PK, et al. (1985) Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* 228: 1201-1204.
364. Kanki PJ, McLane MF, King NW, Jr., Letvin NL, Hunt RD, et al. (1985) Serologic identification and characterization of a macaque T-lymphotropic retrovirus closely related to HTLV-III. *Science* 228: 1199-1201.
365. Sharp PM, Hahn BH (2011) Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1: a006841.
366. Apetrei C, Kaur A, Lerche NW, Metzger M, Pandrea I, et al. (2005) Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus SIVsm in U.S. primate centers unravels the origin of SIVmac and SIVstm. *J Virol* 79: 8991-9005.
367. Apetrei C, Lerche NW, Pandrea I, Gormus B, Silvestri G, et al. (2006) Kuru experiments triggered the emergence of pathogenic SIVmac. *AIDS* 20: 317-321.
368. Fultz PN, McClure HM, Anderson DC, Swenson RB, Anand R, et al. (1986) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 5286-5290.
369. Peeters M, Honore C, Huet T, Bedjabaga L, Ossari S, et al. (1989) Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* 3: 625-630.
370. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, et al. (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397: 436-441.
371. Bailes E, Gao F, Bibollet-Ruche F, Courgnaud V, Peeters M, et al. (2003) Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* 300: 1713.
372. Vanden Haesevelde MM, Peeters M, Jannes G, Janssens W, van der Groen G, et al. (1996) Sequence analysis of a highly divergent HIV-1-related lentivirus isolated from a wild captured chimpanzee. *Virology* 221: 346-350.
373. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, et al. (2006) Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 313: 523-526.
374. Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Neel C, Lafay B, et al. (2007) Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon. *Virology* 368: 155-171.
375. Li Y, Ndjanga JB, Learn GH, Ramirez MA, Keele BF, et al. (2012) Eastern chimpanzees, but not bonobos, represent a simian immunodeficiency virus reservoir. *J Virol* 86: 10776-10791.
376. Takehisa J, Kraus MH, Ayoub A, Bailes E, Van Heuverswyn F, et al. (2009) Origin and biology of simian immunodeficiency virus in wild-living western gorillas. *J Virol* 83: 1635-1648.
377. Neel C, Etienne L, Li Y, Takehisa J, Rudicell RS, et al. (2010) Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus infection in wild-living gorillas. *J Virol* 84: 1464-1476.
378. Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, et al. (2006) Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature* 444: 164.
379. D'Arc M, Ayoub A, Esteban A, Learn GH, Boue V, et al. (2015) Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E1343-1352.
380. van Tienen C, Schim van der Loeff M, Whittle H (2012) Effect of HIV-2 infection on HIV-1 disease progression. *N Engl J Med* 367: 1961; author reply 1962-1963.
381. Mourez T, Simon F, Plantier JC (2013) Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clin Microbiol Rev* 26: 448-461.
382. Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, et al. (2008) Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* 455: 661-664.
383. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, et al. (2000) Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288: 1789-1796.

384. Lemey P, Pybus OG, Rambaut A, Drummond AJ, Robertson DL, et al. (2004) The molecular population genetics of HIV-1 group O. *Genetics* 167: 1059-1068.
385. Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, Sewankambo NK, Serwadda D, et al. (2001) Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet* 357: 1149-1153.
386. Rudicell RS, Holland Jones J, Wroblewski EE, Learn GH, Li Y, et al. (2010) Impact of simian immunodeficiency virus infection on chimpanzee population dynamics. *PLoS Pathog* 6: e1001116.
387. Keele BF, Jones JH, Terio KA, Estes JD, Rudicell RS, et al. (2009) Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature* 460: 515-519.
388. Heeney JL, Rutjens E, Verschoor EJ, Niphuis H, ten Haaf P, et al. (2006) Transmission of simian immunodeficiency virus SIVcpz and the evolution of infection in the presence and absence of concurrent human immunodeficiency virus type 1 infection in chimpanzees. *J Virol* 80: 7208-7218.
389. Paiardini M, Pandrea I, Apetrei C, Silvestri G (2009) Lessons learned from the natural hosts of HIV-related viruses. *Annu Rev Med* 60: 485-495.
390. Kirchhoff F (2009) Is the high virulence of HIV-1 an unfortunate coincidence of primate lentiviral evolution? *Nat Rev Microbiol* 7: 467-476.
391. Bosinger SE, Sodora DL, Silvestri G (2011) Generalized immune activation and innate immune responses in simian immunodeficiency virus infection. *Curr Opin HIV AIDS* 6: 411-418.
392. Brenchley JM, Silvestri G, Douek DC (2010) Nonprogressive and progressive primate immunodeficiency lentivirus infections. *Immunity* 32: 737-742.
393. Pandrea I, Sodora DL, Silvestri G, Apetrei C (2008) Into the wild: simian immunodeficiency virus (SIV) infection in natural hosts. *Trends Immunol* 29: 419-428.
394. Huot N, Rasclé P, Garcia-Tellez T, Jacquelin B, Muller-Trutwin M (2016) Innate immune cell responses in non pathogenic versus pathogenic SIV infections. *Curr Opin Virol* 19: 37-44.
395. Micci L, Ryan ES, Fromentin R, Bosinger SE, Harper JL, et al. (2015) Interleukin-21 combined with ART reduces inflammation and viral reservoir in SIV-infected macaques. *J Clin Invest* 125: 4497-4513.
396. Whitney JB, Hill AL, Sanisetty S, Penaloza-MacMaster P, Liu J, et al. (2014) Rapid seeding of the viral reservoir prior to SIV viraemia in rhesus monkeys. *Nature* 512: 74-77.
397. Li H, Richert-Spuhler LE, Evans TI, Gillis J, Connole M, et al. (2014) Hypercytotoxicity and rapid loss of NKp44+ innate lymphoid cells during acute SIV infection. *PLoS Pathog* 10: e1004551.
398. Xu H, Wang X, Lackner AA, Veazey RS (2015) Type 3 innate lymphoid cell depletion is mediated by TLRs in lymphoid tissues of simian immunodeficiency virus-infected macaques. *FASEB J* 29: 5072-5080.
399. Saez-Cirion A, Jacquelin B, Barre-Sinoussi F, Muller-Trutwin M (2014) Immune responses during spontaneous control of HIV and AIDS: what is the hope for a cure? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369: 20130436.
400. Pollom E, Dang KK, Potter EL, Gorelick RJ, Burch CL, et al. (2013) Comparison of SIV and HIV-1 genomic RNA structures reveals impact of sequence evolution on conserved and non-conserved structural motifs. *PLoS Pathog* 9: e1003294.
401. Affranchino JL, Gonzalez SA (2014) Understanding the process of envelope glycoprotein incorporation into virions in simian and feline immunodeficiency viruses. *Viruses* 6: 264-283.
402. Chen Z, Yan Y, Munshi S, Li Y, Zugay-Murphy J, et al. (2000) X-ray structure of simian immunodeficiency virus integrase containing the core and C-terminal domain (residues 50-293)--an initial glance of the viral DNA binding platform. *J Mol Biol* 296: 521-533.
403. Hassounah SA, Mesplede T, Quashie PK, Oliveira M, Sandstrom PA, et al. (2014) Effect of HIV-1 integrase resistance mutations when introduced into SIVmac239 on susceptibility to integrase strand transfer inhibitors. *J Virol* 88: 9683-9692.

404. Hassounah SA, Liu Y, Quashie PK, Oliveira M, Moisi D, et al. (2015) Characterization of the Drug Resistance Profiles of Integrase Strand Transfer Inhibitors in Simian Immunodeficiency Virus SIVmac239. *J Virol* 89: 12002-12013.
405. Hazuda DJ, Young SD, Guare JP, Anthony NJ, Gomez RP, et al. (2004) Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques. *Science* 305: 528-532.
406. Hladik F, McElrath MJ (2008) Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* 8: 447-457.
407. Vidricaire G, Tremblay MJ (2004) [For a better understanding of the mechanisms involved in vertical transmission of HIV]. *Med Sci (Paris)* 20: 784-787.
408. Norvell MK, Benrubi GI, Thompson RJ (1984) Investigation of microtrauma after sexual intercourse. *J Reprod Med* 29: 269-271.
409. Wu L, KewalRamani VN (2006) Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 6: 859-868.
410. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, et al. (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100: 587-597.
411. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, et al. (2000) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100: 575-585.
412. Rubbert A, Combadiere C, Ostrowski M, Arthos J, Dybul M, et al. (1998) Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J Immunol* 160: 3933-3941.
413. Turville SG, Arthos J, Donald KM, Lynch G, Naif H, et al. (2001) HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood* 98: 2482-2488.
414. Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, et al. (1997) Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 3: 1369-1375.
415. de Witte L, Nabatov A, Pion M, Fluitsma D, de Jong MA, et al. (2007) Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med* 13: 367-371.
416. Macatonia SE, Lau R, Patterson S, Pinching AJ, Knight SC (1990) Dendritic cell infection, depletion and dysfunction in HIV-infected individuals. *Immunology* 71: 38-45.
417. Granelli-Piperno A, Golebiowska A, Trumpfheller C, Siegal FP, Steinman RM (2004) HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7669-7674.
418. Sapp M, Engelmayer J, Larsson M, Granelli-Piperno A, Steinman R, et al. (1999) Dendritic cells generated from blood monocytes of HIV-1 patients are not infected and act as competent antigen presenting cells eliciting potent T-cell responses. *Immunol Lett* 66: 121-128.
419. Moir S, Malaspina A, Ogwaro KM, Donoghue ET, Hallahan CW, et al. (2001) HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10362-10367.
420. Haynes BF, Fleming J, St Clair EW, Katinger H, Stiegler G, et al. (2005) Cardiophilin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* 308: 1906-1908.
421. Naif HM, Li S, Alali M, Sloane A, Wu L, et al. (1998) CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 72: 830-836.
422. Perno CF, Svicher V, Schols D, Pollicita M, Balzarini J, et al. (2006) Therapeutic strategies towards HIV-1 infection in macrophages. *Antiviral Res* 71: 293-300.
423. Kedzierska K, Azzam R, Ellery P, Mak J, Jaworowski A, et al. (2003) Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J Clin Virol* 26: 247-263.
424. Mavilio D, Lombardo G, Kinter A, Fogli M, La Sala A, et al. (2006) Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 infection. *J Exp Med* 203: 2339-2350.

425. Girard MP, Osmanov S, Assossou OM, Kiény MP (2011) Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: a review. *Vaccine* 29: 6191-6218.
426. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, et al. (2009) Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 361: 2209-2220.
427. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, et al. (2012) Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med* 366: 1275-1286.
428. Fauci AS, Marston HD (2015) PUBLIC HEALTH. Toward an HIV vaccine: A scientific journey. *Science* 349: 386-387.
429. Fauci AS (2016) An HIV Vaccine: Mapping Uncharted Territory. *JAMA* 316: 143-144.
430. Kwon YD, Pancera M, Acharya P, Georgiev IS, Crooks ET, et al. (2015) Crystal structure, conformational fixation and entry-related interactions of mature ligand-free HIV-1 Env. *Nat Struct Mol Biol* 22: 522-531.
431. De Clercq E (2010) Antiretroviral drugs. *Curr Opin Pharmacol* 10: 507-515.
432. Shafer RW, Schapiro JM (2008) HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev* 10: 67-84.
433. Ciuffi A, Llano M, Poeschla E, Hoffmann C, Leipzig J, et al. (2005) A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med* 11: 1287-1289.
434. Demeulemeester J, Tintori C, Botta M, Debyser Z, Christ F (2012) Development of an AlphaScreen-based HIV-1 integrase dimerization assay for discovery of novel allosteric inhibitors. *J Biomol Screen* 17: 618-628.
435. Klasse PJ, Sattentau QJ (2002) Occupancy and mechanism in antibody-mediated neutralization of animal viruses. *J Gen Virol* 83: 2091-2108.
436. Degorce F, Card A, Soh S, Trinquet E, Knapik GP, et al. (2009) HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications. *Curr Chem Genomics* 3: 22-32.
437. Cherepanov P (2007) LEDGF/p75 interacts with divergent lentiviral integrases and modulates their enzymatic activity in vitro. *Nucleic Acids Res* 35: 113-124.
438. TSANTRIZOS Y, S. (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), BAILEY, Murray, D. (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), BILODEAU, François (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), CARSON, Rebekah, J. (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), COULOMBE, René (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), FADER, Lee (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), HALMOS, Teddy (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), KAWAI, Stephen (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), LANDRY, Serge (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), LAPLANTE, Steven (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), MORIN, Sébastien (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), PARISIEN, Mathieu (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), POUPART, Marc-André (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), SIMONEAU, Bruno (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), (2009) INHIBITORS OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS REPLICATION. BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH (Binger Strasse 173, Ingelheim, 55216, DE), TSANTRIZOS, Youla, S. (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), BAILEY, Murray, D. (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), BILODEAU, François (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), CARSON, Rebekah, J. (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), COULOMBE, René (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), FADER, Lee (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), HALMOS, Teddy (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), KAWAI, Stephen (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), LANDRY, Serge (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), LAPLANTE, Steven (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), MORIN, Sébastien (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), PARISIEN, Mathieu (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), POUPART, Marc-André (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA), SIMONEAU, Bruno (2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5, CA),.

439. Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N (1985) Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 229: 563-566.
440. Kodama T, Wooley DP, Naidu YM, Kestler HW, 3rd, Daniel MD, et al. (1989) Significance of premature stop codons in env of simian immunodeficiency virus. *J Virol* 63: 4709-4714.
441. Bushman FD, Engelman A, Palmer I, Wingfield P, Craigie R (1993) Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3428-3432.
442. Kessl JJ, Kutluay SB, Townsend D, Rebensburg S, Slaughter A, et al. (2016) HIV-1 Integrase Binds the Viral RNA Genome and Is Essential during Virion Morphogenesis. *Cell* 166: 1257-1268 e1212.
443. Mori M, Kovalenko L, Lyonnais S, Antaki D, Torbett BE, et al. (2015) Nucleocapsid Protein: A Desirable Target for Future Therapies Against HIV-1. *Curr Top Microbiol Immunol* 389: 53-92.
444. Vranckx LS, Demeulemeester J, Saleh S, Boll A, Vansant G, et al. (2016) LEDGIN-mediated Inhibition of Integrase-LEDGF/p75 Interaction Reduces Reactivation of Residual Latent HIV. *EBioMedicine* 8: 248-264.
445. Akiyama H, Ishimatsu M, Miura T, Hayami M, Ido E (2008) Construction and infection of a new simian/human immunodeficiency chimeric virus (SHIV) containing the integrase gene of the human immunodeficiency virus type 1 genome and analysis of its adaptation to monkey cells. *Microbes Infect* 10: 531-539.

RESUME

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est l'agent causal de la pandémie du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Les rétrovirus ont la capacité de rétro-transcrire leur génome ARN en ADN afin qu'il soit intégré dans celui de l'hôte. Les traitements antirétroviraux (ART) actuels combinent plusieurs classes d'antirétroviraux (ARV) ciblant majoritairement les enzymes virales nécessaires à la réplication du VIH-1: la reverse transcriptase (RT), la protéase (PR) et l'intégrase (IN). L'émergence et la transmission de virus multirésistants à l'ensemble des ARV illustrent la nécessité de développer de nouveaux mécanismes thérapeutiques. Les inhibiteurs catalytiques d'IN (INSTIs) utilisés dans les ART ciblent le site actif de l'enzyme et empêchent ainsi la réaction de transfert de brin de l'intégration du VIH-1. La protéine cellulaire Lens Epithelium-Derived Growth Factor (LEDGF/p75), liée à la chromatine, est l'un des principaux cofacteurs de IN. En permettant le ciblage de l'intégration dans des régions actives du génome de l'hôte, l'interaction IN-LEDGF joue un rôle crucial pour la réplication effective du VIH-1 ce qui en fait une cible de premier ordre pour de nouvelles thérapies.

Au cours de ces dernières années, des inhibiteurs allostériques de l'interaction IN-LEDGF (INLAIs encore appelés LEDGINs ou ALLINIs) ont été développés afin d'inhiber l'étape d'intégration. De manière inattendue, ces molécules exercent de fait une double activité antirétrovirale. En effet les INLAIs ciblent l'intégration mais possèdent également une seconde activité plus efficace sur les étapes tardives de la réplication du VIH-1. Celle-ci se traduit par la production de virions présentant un défaut d'infectivité. Mon projet de thèse, réalisé en partenariat avec la société biopharmaceutique Mutabilis, s'est intéressé à la caractérisation de l'activité antirétrovirale d'une nouvelle classe d'INLAIs selon deux axes: (1) l'approfondissement des mécanismes d'action de ces INLAIs sur les étapes tardives de la réplication du VIH-1 ; (2) l'appréciation de leur spectre d'activité sur la réplication du virus de l'immunodéficience simienne (SIV).

J'ai pu montrer que les virions produits en présence d'INLAIs développées par Mutabilis présentent un défaut de transcription inverse lors de l'infection des cellules cibles, qui les rend non infectieux. Ces molécules n'influencent pas les étapes tardives de maturation protéique et d'empaquetage de l'ARN du VIH-1 dans les virions. De façon intéressante, ces virions non infectieux sont efficacement reconnus par un panel d'anticorps neutralisants spécifiques de l'enveloppe virale du VIH-1 et conservent la capacité d'induire une réponse immunitaire T CD4+ de type Th1 dans des cellules de patients infectés. Nous avons également évalué l'effet des INLAIs sur la réplication du SIV. Des expérimentations *in vitro* ont permis de montrer que certaines INLAIs inhibent efficacement l'interaction IN-LEDGF mais n'induisent pas la multimérisation anormale de IN SIV contrairement à ce que nous observons pour IN VIH-1. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* et indiquent que si certaines INLAIs de seconde génération montrent une activité antirétrovirale au cours des étapes précoces, elles ne sont pas capables d'inhiber efficacement les étapes tardives de la réplication du SIV. De fait, la production de virions SIV en présence de ces INLAIs n'entraîne qu'une faible diminution de leur infectivité.

Mes travaux ont donc permis de mettre en évidence que les virions "inactivés" par ces INLAIs pourraient représenter un nouveau type d'immunogènes pour l'établissement d'une réponse immunitaire anti VIH-1. Cependant l'étude du spectre d'activité suggère que bien que la capacité de certaines INLAIs à inhiber l'interaction IN-LEDGF/p75 semble relativement bien conservée entre le VIH-1 et SIV, elles sont peu efficaces sur les étapes tardives du cycle de réplication du SIV.