

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



## Mémoire

de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master II

Filière : Biologie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème

# LA MACHINERIE GAG DU TRAFIC ET DE L'ASSEMBLAGE DU VIH-1: MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

Travail réalisé par Melle ZALOUK Rachida

Soutenu le : 25/09/2017 devant le jury composé de :

**PRESIDENT:** Mr. BOUAZZA B. Maitre de conférences A à l'UMMTO

**PROMOTEUR:** Mr. YEZID H. Maitre de conférences B à l'UMMTO

**EXAMINATEUR:** Mr. SEBBANE H. Maitre Assistant A à l'UMMTO

Année universitaire 2016-2017

## *Remerciements :*

En premier lieu, je tiens à remercier Dieu le tout puissant pour nous avoir donné santé, force, courage et volonté afin de mener à bien ce travail.

Mes chaleureux remerciements vont à Monsieur YEZID H. : Maître de conférences B à l'UMMTO, pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur de ce mémoire. Je le remercie de m'avoir guidé pas à pas à travers ses conseils pertinents et sa disponibilité. Ce modeste travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et mon profond respect.

Tous mes remerciements s'adressent aux lecteurs de ce manuscrit qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

A Mr. BOUAZZA B. Maître de conférences A à l'UMMTO, pour l'intérêt qu'il porte à ce travail et pour sa disponibilité à présider le jury d'évaluation.

A Mr. SEBBANE H. Maître Assistant A pour avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de ses nombreuses autres obligations.

## *Dédicace :*

Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes parents, qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et soucis de tendresse et d'affection pour tout ce qu'ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade.

A ma mère qui m'a encouragé durant toutes mes études, et qui sans elle, ma réussite n'aurait pas eu lieu. Qu'elle trouve ici mon amour et mon affection.

A mes sœurs Lynda, Nacira, Thilleli.

A ma sœur Karima et sa famille

A mon frère Samir et sa famille

Dr Mechouat

A tout mes amis et ma promotion

A tout ce que j'ai connu durant mon cycle d'étude

## Liste des abréviations :

AAA-ATPase : ATPase Associated with cellular Activities

ABCE1 : ATP binding cassette E1 protein

AP: Activated protein

Arf : ADP-ribosylation factor

ARNis : ARN interférent

ARNm : ARN messager

ARNt<sup>LYS</sup> : ARN transfert

AZT : Azidothymidine

CA : Capside

CCR5 : C-C chemokine receptor 5

CD : Cluster de Différenciation.

CRF : Circulating Recombinant Form

CRM1 : Chromosome région maintenance 1

CTE : Elément du transport constitutif

CXCR4 : Chemokine CXC receptor 4

CYP-A : Cyclophiline A

DAG : Diacyglycérol

DICER : Enzyme endoribonuclease Dicer

Env : Enveloppe

ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport.

Gag : Groupe antigène

GDP : Guanosine diphosphate

Gp : Glycoprotéine

GTP : Guanosine triphosphate

HAART : Highly Active Antirétroviral Therapy

HBR : Région hautement basique

HRI : Heptad repeat I

HRII : Heptad repeat II

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule type 1

IN : intégrase

INNTI : Inhibiteurs Non Nucléosidiques de la Transcriptase inverse

INTI : Inhibiteurs Nucléosidique de la Transcriptase Invers

IP : Inhibiteurs de la Protéase

LTR : Long Terminal Repeat

MA : Matrice

MAP - kinase : Mitogen Activated Protéine Kinase

MTOC : Centre d'organisation microtubule perinucléaires

MVBs : Corps multivesiculaires

NC : Nucléocapside

Need4 :Ubiquitine ligase

Nef : Negative regulatory factor

NES : Nuclear Export Signal

NF-AT : Nuclear Factor of Activated T cells

NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor- $\kappa$ B

NLS : Nuclear Localization Signal

NMT : N-myristoyltransferase

PDB : Banque de Données Protéique

PH domain : Pleckstrin homology

PI : Phosphatidylinositol

PIC : Preintegration Complex

PIP2 : Phosphatidylinositol-(4,5) bisphosphate

PIP3 : Phosphatidylinisitol triphosphate

PI-K : Phosphatedylinositol –Kinase

PLC : Phospholipase C

Pol : Polymérase

PR : protéase

P-TEFb : Positive Transcription Elongation Factor b

Ran GTPase :(GTP binding) Ras related nuclear protéine

Rev : Regulator of expression of viral protéine

RNase L : Ribonucléase L

R : Repeated,région centrale

RRE : Rev Responsive Element

RT : Reverse Transcriptase

RTC : Reverse Transcription Complex

SP1 : Spacer 1

TGN : Network trans-Golgi

TAR : Transactivation Responsive element

TAT : Transactivator of transcription

TEN : Network endosomique tubulaire

TRIM5a : Tripartite motif protéine 5a

TSg101 : Tumor susceptibility gène 101

U3 : Unique extrémité 3'

U5 : Unique,extrémité 5'

V-ATPase : Enzyme d'adénosine triphosphate de type V.

Vif : Viral infectivity factor

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine.

VLPs : Virus Like particules

Vpr : Viral protéine R

Vps : Vacuolar protien sorting

Vpu : Protéine viral

## Liste des Tableaux :

Tableau I: Molécules antirétrovirales inclus dans les traitements actuels .....	31
Tableau II: Protéines cellulaire incorporées sur les virions VIH-1 .....	51

## Liste des Figures :

Figure-1: Schéma de la morphologie de VIH-1 et l'organisation de leur génome <sup>[15]</sup> .....	18
Figure-2: Le cycle de réplication de VIH-1 .....	20
Figure-3: Evolution clinique de l'infection VIH-1 <sup>[26]</sup> .....	25
Figure-4: Répartition subcellulaire des phosphoinositides et des enzymes du métabolisme des phosphoinositides dans les voies trafic de la membrane cellulaire.....	33
Figure-5: Structure du Phosphatidylinositol-(4.5)- bisphosphate. ....	34
Figure-6: Schématisation des différentes fonctions du PI(4.5)P2 .....	35
Figure-7: Schéma montrant la structure et fonctions de Gag .....	37
Figure-8: Schéma représentant l'association de Gag du VIH-1 avec le PI(4.5)P2 situé sur la MP .....	44
Figure-9:Schéma de la régulation par Rev de l'export nucléaire des transcrits viraux vers le cytoplasme. ....	49
Figure-10: Schéma représentant les stades tardifs du cycle de réplication du VIH-1.....	53
Figure-11:Représentation schématique du rôle du complexe ESCRT dans la libération du VIH-1. ....	55
Figure-12: Structure RMN de MA du VIH-1 liant le phosphatidylinositol-4.5-bisphosphate [PI(4.5)P2] sur la membrane.....	58
Figure-13: Structure de la CA mature du VIH-1.....	60
Figure 14: Structure de NC liée a la tige boucle de SL3 de la séquence signal d'encapsidation de l'ARN du VIH-1 .....	62
Figure 15: Représentation schématique de la machinerie ESCRT et son interaction avec Gag du VIH-1 sur la membrane plasmique. ....	64

## Sommaire

Remerciements :	2
Dédicace :	3
Liste des abréviations :	4
Liste des Tableaux :	7
Liste des Figures :	7
Résumé:	10
Abstract	11
Introduction générale :	12
1 Introduction :	14
2-Structure et génome du VIH-1 :	15
2-1Gènes de structure :	15
2-2 Gènes de régulation:	16
3-Les différentes classes du VIH-1	18
4-Cycle de réplication du VIH-1:	19
4-1 Attachement et fusion:	20
4-2 Transcription inverse et décapsidation:	21
4-3 Import nucléaire du complexe de pré-intégration:	21
4-4 Intégration:	22
4-5 Transcription du génome viral	23
4-6 Export des ARNm viraux vers le cytoplasme et synthèse des protéines virales.....	23
4-7 Assemblage et bourgeonnement.....	24
5-Les stades de l'infection :	25
5-1 Le stade de primo-infection.....	25
5-2 Le stade asymptomatique .....	26
5-3 Le stade SIDA .....	26
6-Transmission :	26
6-1 Transmission sexuelle .....	26
6-2 Transmission par le sang et ses dérivés.....	26
6-3 Transmission mère-enfant .....	27
7-Thérapies actuels des infections VIH-1 :	27
7-1 Approche pharmacologique .....	27
7-1-1 Transcription inverse .....	27

7-1-2 Intégration .....	28
7-1-4 Maturation.....	28
7-2 Approche utilisant les ARN interférent.....	28
7-3 Approche immunologique.....	29
Partie 02 : La biologie de l'assemblage du VIH-1.....	32
1- Rappels :.....	32
2- Rôles du précurseur Gag pr55 dans l'assemblage du virus: .....	36
3-Les sites d'assemblage du VIH-1: .....	42
4- Déplacement de Gag et localisation sur les sites d'assemblage : .....	43
5-Les facteurs cellulaires permettant l'assemblage de Gag: .....	44
6-Le rôle de la voie d'exportation d'ARN viral dans le déplacement de Gag et de l'assemblage : .....	48
7- Biosynthèse, maturation, transport et incorporation des glycoprotéines de l'enveloppe "gp160" .....	50
8- Incorporation des protéines virales et cellulaires.....	50
9- Protéines cellulaires de l'hôte incorporées par le VIH-1:.....	50
10-Bourgeonnement et maturation des particules virales .....	51
11- Libération des particules virales du VIH-1:.....	54
12- Maturation des particules virales : .....	55
Partie 03 : Les Thérapies en cours de développement ciblant l'assemblage du VIH-1.....	56
1-Introduction:.....	56
2-Gag: cible des thérapies antirétrovirale.....	56
Thérapies ciblant MA: .....	57
Thérapies ciblant CA: .....	58
Thérapies ciblant NC: .....	61
Thérapies ciblant P6: .....	62
Conclusion générale.....	65
Références bibliographiques:.....	67

## Résumé

Une propriété caractéristique des rétrovirus est leur capacité à se constituer en particules virales capable de quitter les cellules productrices (LT CD4+) et se propager vers les autres cellules et hôtes susceptibles. La morphogénèse des Virions se fait en trois stades: l'assemblage, le virion est créé et les composants essentiels sont emballés; le bourgeonnement, dans lequel le virion fusionne avec la membrane plasmique et obtient son enveloppe lipidique; enfin la maturation, durant cette étape le virion change de structure et devient infectieux. Toutes ces étapes sont coordonnées par une polyprotéine Gag et ses produits de maturation protéolytique, qui fonctionnent comme les principales protéines structurantes du virus. Les molécules Gag sont disposées radialement, adhérant à la membrane interne de la membrane virale et étroitement associées à un réseau hexagonal et paracrystallin. Gag comprend trois grands domaines structurels matrice (MA), capsid (CA) et nucléocapsid (NC) qui interagissent avec de nombreuses protéines cellulaires impliquées dans les processus d'assemblage et de bourgeonnement qui se déroulent au niveau de la membrane plasmique de l'hôte. Certains membres de la famille des phosphoinositides sont très présents sur des sites membranaires particulièrement au sein de certains types cellulaires et jouent un rôle important dans le déplacement de certaines protéines ainsi que les processus de signalisation associés. Par exemple le phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate [PI(4,5)P2] est présent sur les feuillettes interne de la membrane plasmique. Le PI(4,5)P2 recrute Gag sur la membrane plasmique et permet la production des virions VIH-1. Les résidus basiques présents sur MA sont directement impliqués dans les interactions avec le PI(4,5)P2. La protéine MA est responsable du ciblage et de l'attachement de Gag à la membrane plasmique de la cellule hôte. L'interaction de la protéine NC avec l'ARN viral simple brin de taille génomique permet son encapsidation. Enfin, la multimérisation des précurseurs Gag et Gag-Pol est facilitée par un domaine localisé à l'extrémité C-terminale de CA.

**Mots clés :** Gag, PI(4,5)P2, Assemblage, VIH-1, LT CD4.

## **Abstract**

A defining property of retroviruses is their ability to assemble into particles that can leave producing cells (LT CD4+) and spread infection to susceptible cells and hosts. Virion morphogenesis can be divided into three stages: assembly, wherein the virion is created and essential components are packaged; budding, wherein the virion crosses the plasma membrane and obtains its lipid envelope; and maturation, wherein the virion changes structure and becomes infectious. All of these stages are coordinated by the Gag polyprotein and its proteolytic maturation products, which function as the major structural proteins of the virus. The Gag molecules are radially arranged, adherent to the inner leaflet of the viral membrane, and closely associated as a hexagonal, paracrystalline lattice. Gag contains three major structural domains called MA, CA, and NC and cellular proteins involved in the assembly and budding processes that occur at the plasma membrane. Some members of the phosphoinositides family are enriched on membrane sites especially within certain cells and plays an important role in the movement of certain proteins and signaling processes. For example, phosphatidylinositol- (4,5) -bisphosphate [PI (4,5) P2] is present on the inner side of the plasma membrane. PI (4,5) P2 recruits Gag on the plasma membrane and allows the production of HIV-1 virions, and that the basic residues in MA are involved in direct interactions with PI (4,5) P2. The MA protein is responsible for the targeting and attachment of Gag to the plasma membrane of the host cell. The interaction of NC protein with genomic-sized single-stranded viral RNA allows its encapsidation. Finally, multimerization of the Gag and Gag-Pol precursors is facilitated by a domain located at the C-terminal end of CA.

**Key words :** Gag, PI(4.5)P2, assembly, HIV-1, LT CD4

## **Introduction générale :**

Le Virus de l'Immunodéficience-Humaine type1 (VIH-1) constitue l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Il appartient à la famille des *Rétroviridae*, du genre *Lentivirus* générant des maladies à évolution lente. Le VIH-1 cible spécifiquement le système immunitaire humain, infectant principalement les lymphocytes T auxiliaires (CD4+), les macrophages et les cellules dendritiques. Lorsqu'une personne est contaminée par le VIH-1, le virus se propage rapidement dans son organisme. Différentes phases surviennent après la contamination. Les cellules du système immunitaire (LT CD4+) vont peu à peu être détruites. Lorsque les cellules de défense immunitaire sont en nombre insuffisant, l'immunité n'est plus efficace. Des infections graves dues à des souches bactériennes, des virus et des champignons peuvent alors se développer. On appelle ces maladies « maladies opportunistes », parce qu'elles profitent de la baisse de l'immunité pour se développer. Lorsqu'une personne présente une ou plusieurs de ces infections, on dit qu'elle a le SIDA. La progression de la maladie dépend du type, de la souche et de la virulence du virus. Mais aussi de certaines caractéristiques personnelles comme le fait d'avoir ou non un système immunitaire efficient. Le SIDA est le dernier stade de la maladie.

À l'heure actuelle, plus de 40 millions de personnes sont infectées par le VIH-1, la majeure partie est située en Afrique subsaharienne. Aucun vaccin de prévention à l'infection par le VIH-1 n'est disponible actuellement et les seuls traitements disponibles sont des médicaments antirétroviraux bloquant les différentes étapes du cycle de vie du virus. Les stratégies de répliquations du VIH-1 assurent la production rapide du virus ce qui provoque le développement de la résistance aux traitements suite à l'apparition de diverses mutations du virus. La répliquation du VIH-1 dans les cellules infectées est étroitement liée à la biologie des cellules hôtes et progresse à travers une série d'étapes finement orchestrées, elle se déroule en 2 phases: phase précoce et phase tardive.

Les premiers événements commencent lorsque le VIH-1 se lie au récepteur CD4 de la cellule hôte et ensuite à l'un des co-récepteurs aux chimiokines, CCR5 ou CXCR4. Par la suite, les membranes virales et cellulaires fusionnent, la capsid virale entre dans le cytoplasme, la transcriptase inverse de l'enzyme virale (RT) copie le génome viral (ARNv) en une copie d'ADN qui, ensuite, trafique vers le noyau, où l'intégrase virale (IN) catalyse l'intégration de cette copie d'ADN dans les chromosomes de l'hôte pour générer un provirus intégré. Au cours des événements ultérieurs (étapes tardives), l'ARN polymérase II de l'hôte transcrit l'ADN proviral vers des ARNm viraux. Des ARNv épissés et non épissés (longueur complète) sont transportés vers le cytoplasme et traduits en plusieurs précurseurs

structurels de polyprotéines [le précurseur Gag Pr55<sup>Gag</sup>, le précurseur Gag-Pol Pr160<sup>GagPol</sup> et le précurseur glycoprotéine enveloppe gp160], ainsi que plusieurs protéines accessoires et régulatrices.

Ce travail est consacré à la description des données récentes des différentes étapes du processus d'assemblage du VIH-1 et de l'intérêt de cibler ces étapes comme voie de développement de thérapie. Des progrès considérables ont été réalisés afin de déterminer le rôle orchestrer par Gag qui interagit avec lui-même et avec d'autres composants viraux lors du processus d'assemblage.

Le Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4.5)P2], qui constitue environ 1% des phospholipides de la face interne de la membrane plasmique, Le PI(4.5)P2 ancre plusieurs protéines à la membrane plasmique via des interactions avec le domaine Pleckstrin Homology (PH) et d'autres domaines structuraux connus. Il est capable d'activer de nombreux canaux ioniques situés sur la membrane plasmique. Le PI(4.5)P2 est requis pour l'endocytose ainsi que la phagocytose, et plusieurs étapes de l'exocytose et du trafic des vésicules synaptiques. Outre, de nombreuses protéines qui régulent l'actine se lient également aux PI(4.5)P2, ce qui démontre que le PI(4.5)P2 fonctionne comme un second messager pour réguler l'adhésion cytosquelette-membrane. Au cours de l'infection à VIH-1 le PI(4,5)P2 recrute Gag sur la membrane plasmique des cellules infectées et permet la production des virions VIH-1. Les résidus basiques de MA sont impliqués dans les interactions directs avec le PI(4,5)P2. Le virus du VIH-1 utilise une de ses protéines accessoires, Rev, qui lie une séquence de l'ARNv appelé l'élément de réponse Rev (RRE) et le récepteur d'exportation de cellules nucléaires Crm1 (Chromosome région maintenance 1) pour permettre l'export nucléaire des ARN viraux. Le domaine NC qui lié également à l'ARN génomique viral, facilite l'empaquetage de deux copies de l'ARN génomique viral dans chaque nouvelle particule du virus. Pendant la libération des particules, les virions subissent un processus appelé maturation, de sorte que la protéine viral clive les précurseurs polyprotéines Gag et Gag/Pol dont les protéines matures, conduisant à la formation du noyau conique mature. Les Protéines Gag ont un rôle important dans l'assemblage des particules, la libération et la maturation du VIH-1 et agissent aussi sur l'induction de l'infection, malgré leur importance dans le cycle de réplication, il n'existe actuellement aucune thérapie commercialisée ayant pour cible ces facteurs viraux.

Des récentes progressions dans la compréhension de la structure fonction de Gag lors de l'assemblage du virus dans les cellules infectées révèle un nombre potentiel de cible pour la construction de molécules thérapeutique (Waheed & Freed, 2012).

## Partie01 : Rappels et généralités sur le VIH-1

### 1 Introduction

Le VIH-1 est l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Deux espèces sont décrites à ce jour, le VIH-1 responsable de la pandémie actuelle du SIDA et le VIH-2 essentiellement retrouvé en Afrique de l'Ouest. Le VIH-1 est divisé en quatre groupes : M, O, N et P. Le groupe M, groupe majeur comprend lui-même neuf sous-types : A, B, C, D, F, G, H, J et K. Les sous-types sont capables de se recombiner, donnant naissance à des formes recombinantes ou Circulating Recombinant Forms (CRF) (Salemi, Lamers et al., 2005).

L'infection par le virus de l'Immunodéficience Humaine 1 (VIH-1) reste de nos jours un problème majeur de santé publique principalement dans les pays en voie de développement. Plus de 30 millions de personnes sont décédées depuis le début de l'épidémie en 1981 et on estime aujourd'hui que plus de 34 millions de personnes vivent avec le VIH/SIDA dans le monde. À titre d'exemple, 2.7 millions de personnes ont été infectées par ce virus en 2010. Ce qui montre que malgré les politiques de prévention et le développement de thérapies antirétrovirales, qui ne sont malheureusement pas accessibles à toutes les personnes infectées, le VIH/SIDA reste l'une des maladies infectieuses les plus meurtrières du XXI<sup>ème</sup> siècle.

La taille du génome du VIH-1 est d'environ 10 kb, il est composé de deux molécules identiques d'ARN monocaténaire. Ce génome possède la structure de base des rétrovirus : LTR-gag-pol-env-LTR. Les gènes viraux sont au nombre de 9 et codent pour 15 protéines : les gènes *Gag*, *Pol* et *Env* codant pour les protéines de structure, les gènes *Tat*, *Rev* et *Nef* codant pour les protéines régulatrices, et les gènes *Vpu*, *Vpr* et *Vif* codant pour les protéines accessoires. Les séquences LTR (Long Terminal Repeat) sont des séquences répétées, situées aux extrémités du génome du VIH-1. Les LTR sont composées de trois régions: U3 (Unique, extrémité 3'), R (Repeated, région centrale) et U5 (Unique, extrémité 5'). Les séquences LTR sont importantes pour la transcription du génome viral. En effet, la transcription débute au niveau de la région R du LTR5', et s'achève au niveau de la région R du LTR3' contenant une queue polyadénylée. De plus, la séquence LTR5' possède des sites de fixation pour des facteurs de transcription (NFκB, NFAT, SP1...etc.). Enfin, à l'extrémité 3' du LTR5', se trouve le site de fixation de l'ARN de transfert (ARN<sup>t</sup>lys) qui permet l'initialisation de la transcription inverse (Pritchard, Stephens et al., 2000).

L'infection au VIH-1 reste de nos jours un problème majeur de santé publique principalement dans les pays à faible revenu. Depuis que le VIH-1 a été découvert au début des années 80, les

scientifiques n'ont eu cesse de chercher des moyens de lutte contre le virus, de nombreuses molécules inhibitrices ciblant les enzymes virales. Ces enzymes qui sont indispensables au cycle viral et constituent donc des cibles de choix pour la mise au point de molécules inhibitrices. Deux approches ont été particulièrement développées : une approche pharmacologique (mettant en jeu des petites molécules antagonistes des différentes molécules impliquées dans le cycle viral ainsi que de petites molécules analogues aux substrats des enzymes virales et une approche immunologique utilisant des anticorps ou des lymphocytes cytotoxiques CD8+ dirigés spécifiquement contre les différentes protéines virales ou cellulaires. L'une des premières molécules antivirales utilisée pour contrer le VIH-1 fut initialement conçue dans le but d'obtenir une molécule à activité anticancéreuse. Cette molécule, l'AZT ou Azidothymidine, n'eut pas les effets attendus. Mais en 1974 des chercheurs ont démontré qu'elle avait un effet inhibiteur sur le rétrovirus de la leucémie murine de Friend (Yarchoan, Klecker et al., 1986). En 1985, ses propriétés anti-VIH-1 furent démontrées. Depuis cette découverte, des inhibiteurs agissant à chacune des étapes du cycle viral ont été découverts et certains développés jusqu'à l'obtention de leur autorisation de mise sur le marché pour leur utilisation chez l'homme. Ces inhibiteurs médicamenteux permettent aujourd'hui la mise en place de la multi-thérapie, la tri-thérapie (combinaison de 3 molécules active).

## **2-Structure et génome du VIH-1**

Le VIH-1 est un virus dont le génome est constitué de deux molécules d'ARNs identiques simple brin, contenues dans une capsid cylindrique qui renferme également des protéines de structure et des enzymes nécessaires à la réplication virale. Cette nucléocapsid est entourée d'une bicouche lipidique ou enveloppe portant à sa surface des protéines d'origine virale et cellulaire, dont les glycoprotéines.

Le génome du VIH-1 contient plusieurs gènes compris entre les gènes de structure : *Gag*, *Pol*, et *Env*, en plus le VIH-1 contient une série de gènes codant aux différentes protéines régulatrices tels que *Tat*, *Rev*, *Nef*, *Vif*, *Vpr* et *Vpu*. Le VIH-1 est caractérisé par une diversité génétique importante (Beaudeau, 2011).

### **2-1Gènes de structure**

● *Gag* (Group antigène) : Code pour un précurseur pr55<sup>Gag</sup>, clivé par la protéase en différentes protéine :

P17 (Protéine MA) : protéine myristoylée constitue la matrice.

P24 (Protéine CA) : protéine constituant le core, possède une fonction antigénique.

P16 (Protéine 16) : Contient deux protéines P6 et P7 ou NC, ont un rôle dans les interactions ARN capsidique pour son encapsidation, en plus P6 joue un rôle majeur dans la formation des virions.

- *Pol* (Polymérase) : permet l'obtention de précurseur Pr160<sup>Gag-pol</sup>, qui code pour trois enzymes : protéase, transcriptase inverse, et intégrase.

- *Env* (Enveloppe): Subi des modifications post-traductionnelles pour donner une glycoprotéine de 160 KDa qui est clivée par le protéase pour donner deux protéines de l'enveloppe : gp120, gp41 (lortholary, 2000).

## 2-2 Gènes de régulation

- *Tat* (Transactivator of transcription) : C'est un transactivateur de la transcription, constitué de six régions, participe à l'affaiblissement du système immunitaire, elle peut induire l'apoptose cellulaire (Vasilescu, Heath et al., 2003).

- *Rev* (Regulator of Expression of Viral proteins) : Impliquée dans l'export nucléaire d'ARNs mono et non épissés (Malim, Hauber et al., 1989).

- *Nef* ( Negative regulatory Factor): Protéine myristoylée est exprimée en forte concentration dès les premiers stades de l'infection virale (Herbein, Gras et al., 2010).

- *Vpu* (Viral Protein u) : Protéine membranaire, elle a 2 rôles importants : la régulation de l'expression de CD4 et l'augmentation de la production de particules virales (Guatelli, 2009).

- *Vpr* (Viral protéine R) : Protéine tardive a un rôle essentiel pour réguler l'assemblage et la maturation des virions, peut fixer sur ARN et fait partie du complexe de transcription inverse, elle possède une activité anti-protéase (Greene, 1991).

- *Vif* (Viral infectivity factor): Protéine tardive, rôle essentiel dans la régulation de l'assemblage et de la maturation des virions, peut aussi se fixer sur l'ARN et fait partie du complexe de transcription inverse et possède une activité anti-protéase (Henriet, Mercenne et al., 2009).

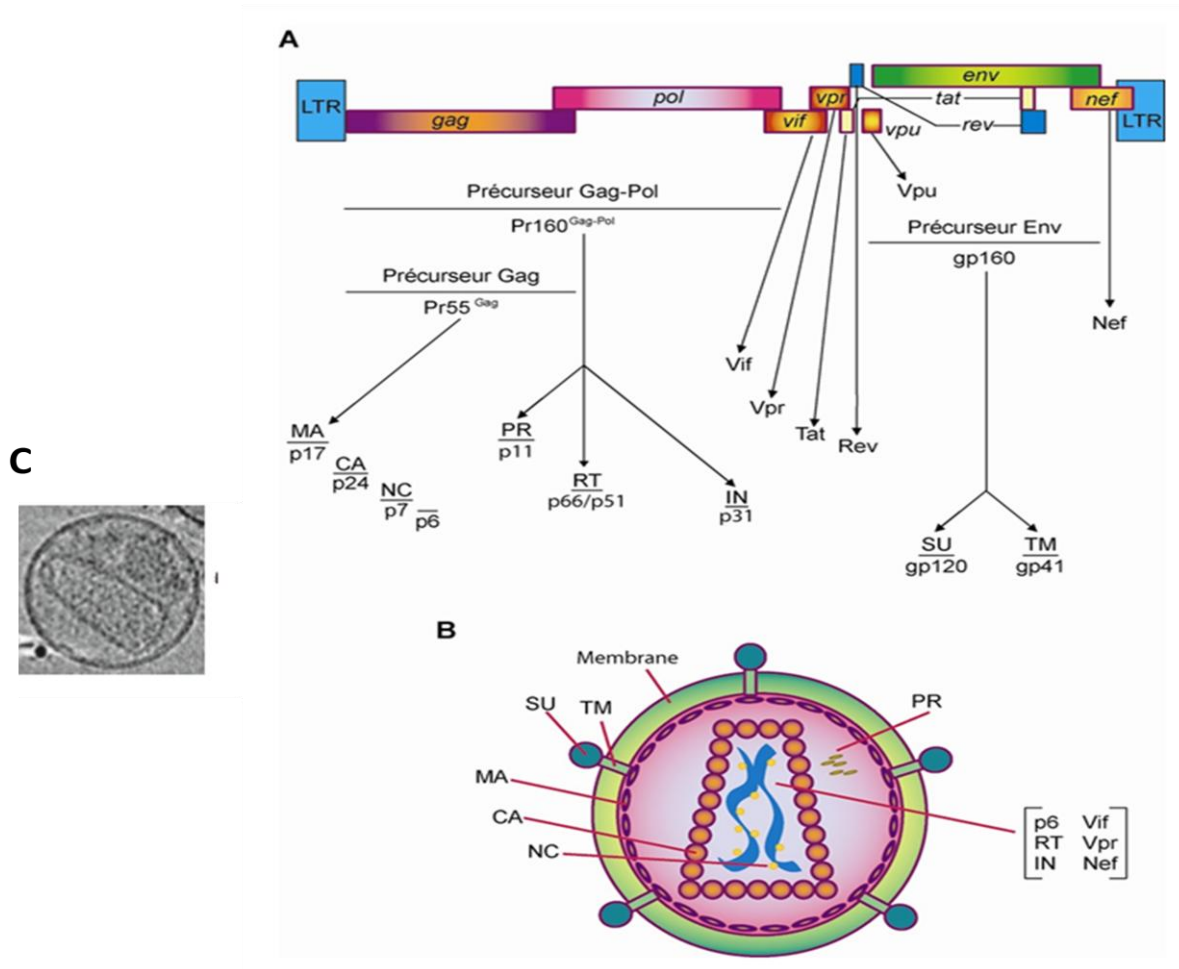
Le VIH-1, observé au microscope électronique, est une particule sphérique de 80 à 120 nm de diamètre. Il est composé, de l'intérieure vers l'extérieur, d'une capsidique à symétrie complexe et une enveloppe hérissée de spicules de deux longueurs différentes. Au centre de la capsidique se trouve le génome virale de structure dense associé a des protéines. L'ensemble génome et capsidique est appelé : cœur viral voire Figure-1 (Larrouy, Chazallon et al., 2010).

### La Capside :

Le VIH-1 appartient à la famille des virus enveloppés, c'est à dire que le virus contient une enveloppe lipidique entourant la capsid virale de type conique.

### L'enveloppe :

L'enveloppe du VIH-1 est composée de deux glycoprotéines virales, insérées dans la bicouche lipidique originaire de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte. La glycoprotéine externe (SU) gp120 et la glycoprotéine transmembranaire (TM) gp41 dérivent du clivage d'un précurseur gp160. Ces deux protéines sont associées par des liaisons non covalentes dans les particules virales (virions), formant des dimères (gp120-gp41) ou des tétramères (gp120-gp41). Il a été démontré que la gp120 seule peut induire une immunité protectrice chez le chimpanzé et actuellement elle fait objet à de nombreux travaux de recherche dans le développement de molécules inhibitrices (Felber & Pavlakis, 1993).



**Figure-1:** Schéma de la morphologie de VIH-1 et l'organisation de leur génome (Vidricaire, 2006)

A : Organisation du génome du VIH-1, B : morphologie du VIH-1, SU (protéine de surface ou gp120), TM (protéine transmembranaire ou gp41), MA (matrice ou p17), CA (capside ou p24), NC (nucléocapside ou p7), PR (protéase), IN (intégrase), RT (transcriptase inverse), Vif (*Viral infectivity factor*), Vpr (*Viral protein R*), Nef (*Negative factor*). Le précurseur Gag pr55 joue un rôle majeur dans l'assemblage des particules. Gag pr55 est composé des protéines de (MA, p17), (CA, p24), d'un polypeptide p6, (NC, p7), polypeptides p1 et p6. Et précurseur pr160<sup>gag-pol</sup> composé de 3 enzyme [(PR, P11), (RT, P66/P51), (IN, P31)]. C : La structure de VIH observé microscopie électronique (Ganser-Pornillos, Yeager et al., 2008).

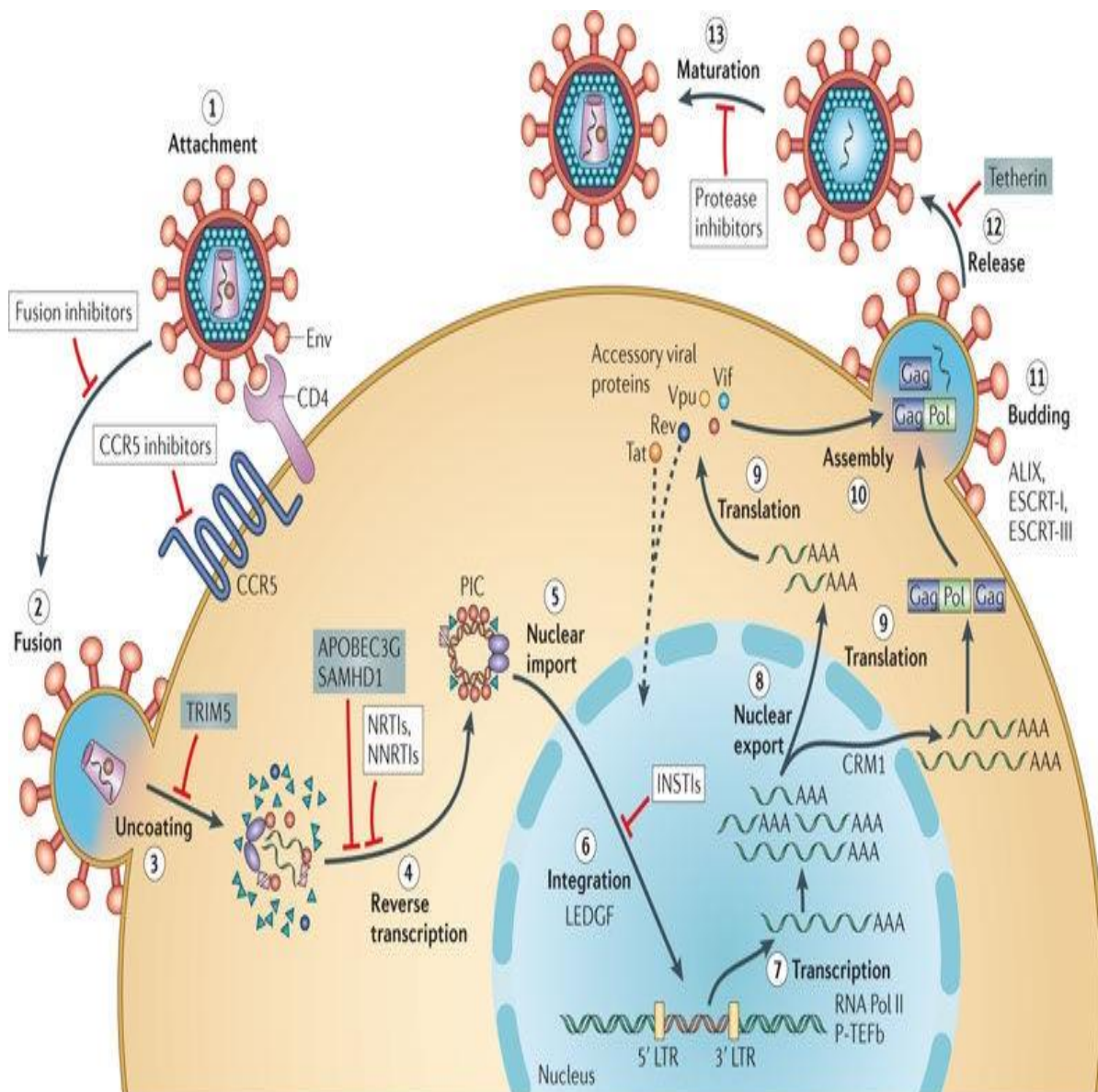
### 3-Les différentes classes du VIH-1

Les virus VIH-1 sont des virus très variables, classés en quatre groupes : M, O, N et, P. Le groupe M est actuellement subdivisé en neuf sous-types (A, B, C, D, F, G, H, J, K) et seize formes recombinantes [Circulating Recombinant Forms (CRFs)]. Au niveau mondial, les VIH-1 non B représentent au moins 90 % des virus circulants. Actuellement, les différentes études montrent une efficacité comparable des thérapeutiques antirétrovirales sur les souches VIH-1 non B, que les traitements soient instaurés lors de la primo-infection ou chez des patients au stade chronique de l'infection. Cependant, la diversité génétique du VIH-1 peut avoir des conséquences sur les voies

généétiques utilisées par le virus pour acquérir une résistance aux antirétroviraux. Le sous-type A est subdivisé en sous-sous-types A1, A2 et plus récemment A3 et A4 pour des virus isolés chez des patients infectés en République démocratique du Congo. Le sous-type F est lui-même subdivisé en sous-sous-type F1 et F2 (Salemi et al., 2005).

#### **4-Cycle de réplication du VIH-1**

La complexité de la persistance du VIH-1 dans les réservoirs cellulaires suggère que le virus établit une relation étroite avec la cellule hôte. En effet, les différentes phases du cycle viral font l'objet de nombreuses interactions entre les protéines virales et cellulaires. Le cycle d'infection du VIH-1 se déroule en plusieurs étapes successives schématisées sur la Figure-2.



**Figure-2:** Le cycle de réplication de VIH-1 (Engelman & Cherepanov, 2012)

Schéma représentant les différentes étapes de cycle de réplication de VIH-1 :

1- Attachement, 2-Fusion, 3-Transcription inverse, 4-Import nucléaire, 5-Intégration, 6-Transcription, 7-Export nucléaire, 8- Traduction, 9-Assemblage, 10-Bourgeonnement, 11-Libération, 12-Maturation.

#### 4-1 Attachement et fusion

La fixation de la gp120 sur le CD4 entraîne un changement de conformation de cette dernière lui permettant d'interagir avec les co-récepteurs CCR5 ou CXCR4. Cette deuxième interaction provoque

une modification de la structure de la gp41 rendant accessible son domaine de fusion N-terminal qui s'ancre alors dans la membrane de la cellule cible. Le rapprochement des membranes virale et cellulaire a lieu grâce à l'interaction entre les domaines HRI (heptad repeat I) et HRII (heptad repeat II) localisés sur le domaine externe de la gp41. Ce rapprochement des deux membranes est suivi par la formation d'un pore de fusion permettant au génome viral de pénétrer dans le cytoplasme de la cellule cible. L'étape d'entrée constitue la première étape du cycle de réplication virale. Le processus d'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles est dépendant des glycoprotéines d'enveloppe virale qui interagissent de façon séquentielle avec des récepteurs cellulaires spécifiques (Beaudeau, 2011).

#### **4-2 Transcription inverse et décapsidation**

Après la fusion, la capsid virale est relarguée dans le cytoplasme où va se dérouler l'étape de transcription inverse. Cette étape se déroule à l'intérieur de la capsid virale. Formation du complexe de transcription inverse (RTC), constitué de l'ARN viral, des protéines virales RT, IN, NC, MA et Vpr, d'un ARNt Lys et de diverses protéines cellulaires. L'interaction du RTC avec les microfilaments d'actine, médiée par la protéine MA phosphorylée est nécessaire à la réalisation d'une transcription inverse efficace (Fassati & Goff, 2001). La transcription inverse est une caractéristique des rétrovirus et représente une étape clef dans le cycle de vie du virus. Au cours de cette transcription inverse, l'ARN viral simple brin est rétro-transcrit en ADN simple brin dans un premier temps puis en ADN double brin grâce à la transcriptase inverse virale (RT) qui possède à la fois une activité transcriptase inverse et une activité nucléase H. Il est à noter qu'il est probable que la décapsidation et la transcription inverse aient lieu de façon parallèle et non séquentielle (Vidricaire, 2006). L'étape de décapsidation suit la phase de transcription inverse. Cette étape est encore mal décrite, mais elle semble passer par des modifications de la protéine de la capsid CA qui subit des phosphorylations par la MAP kinase «Mitogen-Activated Protein Kinase» (Cartier, Sivard et al., 1999). La cyclophiline-A, une protéine chaperonne cellulaire, participe activement dans la déstabilisation des protéines de la capsid (Braaten, Franke et al., 1996). La protéine Vif joue un rôle en augmentant la stabilité du core viral, en s'associant avec la pompe à protons V-ATPase, elle contribue à la décapsidation en provoquant des changements locaux de pH (Ohagen & Gabuzda, 2000).

#### **4-3 Import nucléaire du complexe de pré-intégration**

Une fois la transcription inverse terminée, l'ADN viral synthétisé reste associé à un complexe protéique de poids moléculaire élevé appelé complexe de pré-intégration (PIC) et composé des protéines virales RT, IN, MA, Vpr et de diverses protéines cellulaires. Le PIC est alors acheminé vers le noyau en utilisant le cytosquelette de la cellule. Plusieurs études ont montré l'existence de

nombreuses interactions spécifiques entre les protéines virales et les composants du cytosquelette. Notamment, l'Intégrase (IN) interagit avec des protéines associées aux microtubules et la nucléocapside interagit avec l'actine. Pour que l'intégration puisse avoir lieu, le PIC doit pénétrer dans le noyau de la cellule hôte. L'import nucléaire de l'ADN viral des rétrovirus nécessite la disparition de l'enveloppe nucléaire qui a lieu au cours de la mitose. Particulièrement dans le cas du VIH-1, l'intégration de l'ADN du VIH-1 peut avoir lieu en absence de division cellulaire. Cette propriété confère au VIH-1 la capacité d'infecter des cellules non prolifératives comme les macrophages et les lymphocytes T quiescents. Le diamètre du PIC étant deux fois supérieur à celui du pore nucléaire, la diffusion passive du PIC à travers le pore nucléaire est exclu. D'ailleurs, l'import nucléaire de l'ADN du VIH-1 est dépendant de la présence d'ATP, indiquant qu'il s'agit bien d'un processus actif. L'import nucléaire implique le transport de protéines possédant un signal de localisation nucléaire ou NLS (« Nuclear Localization Signal ») par des protéines appelées importines qui interagissent ensuite avec des composants du pore nucléaire pour permettre l'import de la protéine. Plusieurs déterminants viraux ont été proposés favoriser l'import nucléaire des PIC. Cependant, les mécanismes d'import nucléaire sont sujets à de nombreuses controverses. La protéine MA favorise l'import nucléaire par l'intermédiaire de deux séquences de localisation nucléaire. D'autre part, l'interaction directe de Vpr avec des composants des pores nucléaires faciliterait également l'import nucléaire du PIC. Cependant, les rôles des protéines MA et Vpr dans l'import nucléaire sont largement controversés. Plusieurs séquences putatives de localisation nucléaire ont été également mises en évidence dans l'intégrase (IN). Enfin, il a également été suggéré que le triplex au centre de l'ADN viral, ou séquence Flap, soit nécessaire à l'import nucléaire. Le Flap pourrait permettre à l'ADN d'adopter une conformation favorable pour sa translocation à travers le pore nucléaire. Cependant, les rôles de l'IN et des séquences Flap dans l'import nucléaire ont également été controversés. Ces protéines virales peuvent participer à l'import nucléaire du PIC de manière plus ou moins synergique en fonction du type cellulaire infecté. En conclusion, il n'existe donc pas de consensus quant aux processus exact impliqués dans l'import nucléaire du PIC (Piller, Caly et al., 2003).

#### **4-4 Intégration**

L'intégration de l'ADN viral double brin linéaire issu de la transcription inverse au niveau de l'ADN cellulaire est catalysée par l'intégrase virale (IN). Il a été approuvé *in-vitro* que des complexes de pré-intégration isolés à partir de cellules infectées sont capables d'intégrer les deux extrémités de l'ADN viral en même temps *in vitro* dans l'ADN cible, la réaction d'intégration catalysée par l'intégrase sur dans des expériences *in vitro* donne en majorité une intégration faite sur une seule

extrémité de l'ADN viral. Cette observation a conduit à faire l'hypothèse que d'autres protéines cellulaires seraient nécessaires à la réalisation d'une réaction d'intégration concertée *in vivo*. La recherche de facteurs cellulaires impliqués dans ce processus a permis d'identifier plusieurs protéines cellulaires susceptibles de favoriser l'intégration (Freed, 2001).

#### **4-5 Transcription du génome viral**

La transcription de l'ADN viral est réalisée par la machinerie cellulaire à partir du promoteur viral situé sur la région LTR 5'. La transcription du provirus est régulée notamment par la fixation de facteurs cellulaires sur le promoteur viral. La protéine virale Tat augmente la transcription du VIH-1 en se fixant sur la séquence TAR de l'ARN viral pour recruter le complexe P-TEFb qui favorise l'élongation de la transcription du virus (Vidricaire, 2006).

#### **4-6 Export des ARNm viraux vers le cytoplasme et synthèse des protéines virales**

La transcription du génome du VIH-1 conduit à la formation d'une trentaine de transcrits. Ces transcrits peuvent être divisés en trois classes :

- 1) les ARN viraux non épissés (c'est à dire de taille génomique complète) qui sont soit traduits en précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol, soit dirigés vers la membrane plasmique pour être encapsidés dans les futures virions pour ainsi former le génome des nouveaux virions;
- 2) les ARN viraux partiellement épissés dont la taille est d'environ 5 kb et qui codent pour les protéines Env, Vif, Vpu et Vpr ;
- 3) et enfin les transcrits de petite taille (environ 2 kb), complètement épissés, qui codent les protéines Rev, Tat et Nef.

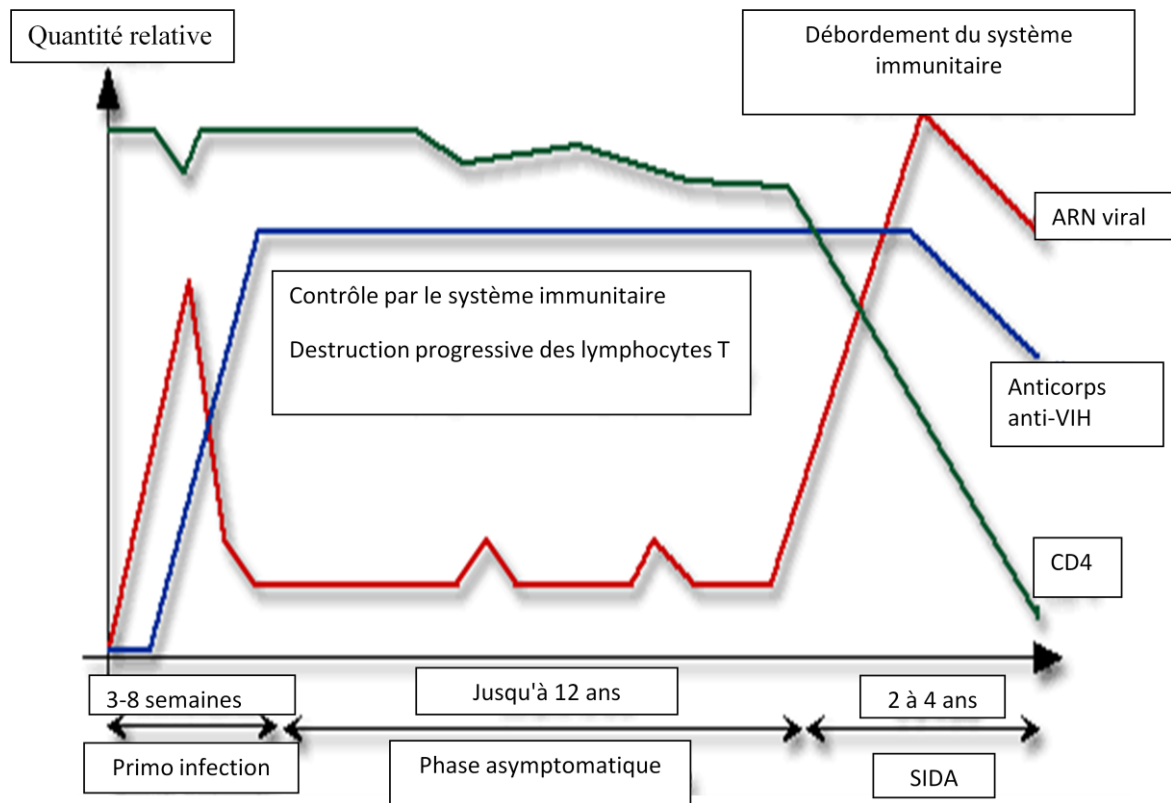
Afin d'éviter la traduction de séquences introniques, seuls les ARNm cellulaires complètement épissés sont exportés vers le cytoplasme. La nécessité pour le VIH-1 d'avoir des transcrits partiellement ou non épissés dans le cytoplasme pour produire une partie de ses protéines pose donc un problème qui est contourné par la protéine virale auxiliaire Rev. L'export des ARN viraux de taille génomique ou partiellement épissés est réalisé grâce à l'interaction de Rev avec la séquence RRE localisée au niveau du gène *Env*. La fixation de Rev sur la séquence RRE conduit à la formation d'un complexe capable d'interagir avec la machinerie d'export nucléaire. En recrutant le facteur cellulaire d'export nucléaire Crm1 « Chromosome région maintenance 1 » de la famille des importines  $\beta$ , la protéine Rev permet le transit des transcrits viraux non épissés ou partiellement épissés à travers les pores nucléaires pour atteindre le cytoplasme. Puisque les transcrits codant les protéines Tat, Rev et Nef sont complètement épissés, de ce fait ils sont rapidement exportés vers le

cytoplasme comme les ARNm cellulaires pour être traduits. La présence de Tat augmente alors la transcription du génome viral ce qui conduit à l'accumulation de plus en plus de protéines précoces. Lorsque la quantité de protéine Rev atteint un seuil critique, elle est importée dans le noyau grâce à sa séquence signal NLS et elle se fixe sur la séquence RRE de l'ARNv. L'export nucléaire des complexes ARNm-Rev implique l'interaction du signal d'export nucléaire (NES, « Nuclear Export Signal ») de Rev avec Crm1 en présence de l'enzyme Ran-GTPase liée au GTP. L'hydrolyse du GTP en GDP dans le cytoplasme permet la libération des complexes ARN-Rev. Les précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol et les protéines Env, Vif, Vpu et Vpr sont alors synthétisées (Cullen, 2003).

#### **4-7 Assemblage et bourgeonnement**

Tous ces événements se rapprochent les uns des autres. L'ARNv est encapsidé. Le processus de maturation, piloté par la protéase virale, va durer jusqu'à l'assemblage définitif de la capside. Le nouveau virion "bourgeonne" et finit par se détacher de la cellule en emportant un fragment de membrane cellulaire avec les glycoprotéines gp120 incorporées. Il faut noter qu'un grand nombre de "particules immatures" sont produites : virus incomplets dépourvus de matériel génétique (donc non infectants) (Fenouillet, Clerget-Raslain et al., 1989). Les détails de la partie assemblage du virus seront abordés dans les chapitres suivants.

## 5-Les stades de l'infection



**Figure-3:** Evolution clinique de l'infection VIH-1 (Hidreau, 2006).

- Ligne rouge : Estimation de taux d'ARN viral dans les trois stades d'infection VIH-1.
- La ligne bleue : Estimation de taux d'anticorps anti-VIH-1 produit par l'organisme infecté durant les trois stades d'infection.
- La ligne noire : Estimation de taux CD4 présent dans le sang durant les trois stades d'infection au VIH-1.

L'infection par le VIH-1 est une infection chronique. Elle est divisé en 3 stades montré sur la Figure-3 :

### 5-1 Le stade de primo-infection

Après contamination par voie sanguine ou sexuelle, le système immunitaire tente d'éliminer le virus sans y parvenir. A ce stade des anticorps anti-VIH-1 sont synthétisés et sont détectés lors des sérologies de dépistage (séropositivité). Cette phase est accompagnée dans les 2/3 des cas par de symptômes le plus souvent mineurs (van't Wout, Kootstra et al., 1994).

## **5-2 Le stade asymptomatique**

Le virus se multiplie à bas bruit dans l'organisme au sein des lymphocytes T auxiliaires CD4+. Cette persistance du virus actif est responsable d'une désorganisation du système immunitaire marquée par une diminution lente du taux de LT CD4, qui passe progressivement de valeurs normales supérieures à 700 cellules/ml à des valeurs inférieures à 500 cellules/ml, parallèlement à une augmentation de la charge virale. Cette phase est de durée très variable avec une évolution totale de l'infection allant de 2 à 10 ans. Elle est caractérisée par l'absence de symptômes dus à l'infection et passe inaperçue si un dépistage sérologique n'est pas réalisé. Des maladies opportunistes dites mineures (candidoses buccales par exemple) commencent à apparaître signant la fin de la phase asymptomatique (Hidreau, 2006).

## **5-3 Le stade SIDA**

Lorsque la déplétion lymphocytaire devient profonde, des maladies opportunistes majeures se déclarent synonyme d'apparition de la phase évoluée de l'infection à VIH-1 avec une immunodépression acquise sévère. Ces maladies opportunistes sont le plus souvent des infections virales CMV (Cytomégalovirus), bactériennes (Tuberculose), ou parasitaires (Pneumocystose), mais aussi des tumeurs (Sarcome de Kaposi), qui se développent après affaiblissement du système immunitaire. Il s'agit de maladies très graves, ne survenant en règle que pour des taux de LT CD4 inférieurs à 500 cellules/ml. Le risque est en effet croissant en dessous de 350 cellules/ml, majeur en dessous de 200 cellules/ml. Elles sont très majoritairement responsables de la mortalité due à l'infection par le VIH-1 (Drupal, 2017).

## **6-Transmission**

### **6-1 Transmission sexuelle**

C'est le mode responsable de plus de 90% des contaminations, elle s'effectue par rapports sexuels avec une personne contaminée.

### **6-2 Transmission par le sang et ses dérivés**

Malgré le dépistage obligatoire depuis 1985, le risque de transmission lors de transfusion de produits sanguins reste de 1 pour 600 000 unités. Le partage de matériel d'injection contaminé chez les toxicomanes ainsi que l'utilisation de matériel non stérilisé sont également responsables de transmission du virus (Kernbaum, 1996).

### **6-3 Transmission mère-enfant**

En l'absence de mesures prophylactiques le risque de transmission est de 15 % en Europe et 30-40 % en Afrique, principalement en période néonatale (fin de grossesse, accouchement), le risque étant majoré par la gravité de la maladie de la mère, et minoré par l'administration de zidovudine chez les mères non antérieurement traitées et par l'accouchement par césarienne programmée. Ces deux mesures associées amènent le risque de transmission à 1-2 %. De plus, la transmission par l'allaitement maternel étant avérée, celui-ci doit être interdit dans la mesure du possible (ouiza, 2005).

### **7-Thérapies actuels des infections VIH-1**

Depuis la découverte du VIH-1, les scientifiques n'ont eu cesse de chercher les moyens de lutte contre le virus, en ciblant de nombreuses enzymes virales sont utilisées au cours du cycle de réplication du VIH-1. Ces enzymes sont indispensables au cycle viral et constituent donc des cibles de choix pour la mise au point de molécules inhibitrices. Trois approches ont été particulièrement développées : une approche pharmacologique, une approche immunologique, et une approche utilisant les ARNs interférents.

#### **7-1 Approche pharmacologique**

les drogues développées agissent à différent niveau du cycle réplcatif du virus:

##### **7-1-1 Transcription inverse**

L'étape de la transcription inverse est une étape clé dans le processus de réplication virale, c'est pour cela qu'elle constitue une cible privilégiée des recherches de molécules inhibitrices. Elle a lieu grâce à l'action de la transcriptase inverse virale qui utilise les nucléotides cellulaires comme substrat. Deux types d'inhibiteurs ont été mis au point, classés suivant leur mode d'action : il s'agit d'inhibiteurs analogues de nucléosides et d'analogues non nucléosidiques.

- Les analogues nucléosidiques (INRT)

Ces inhibiteurs, qui nécessitent une phosphorylation préalable dans la cellule, agissent comme substrat compétiteur et peuvent également arrêter la polymérisation de l'ADN viral. L'inhibiteur nucléosidique le plus connu et utilisé est l'azidothymidine ou AZT (3'azido-3'-deoxythymidine). C'est un analogue de la thymidine. Utilisé en clinique, l'AZT retarde la progression de l'infection vers le stade SIDA, augmente la survie des personnes qui ont déjà atteint le stade SIDA et diminue

considérablement le risque de contamination de la mère à l'enfant. Il est commercialisé sous le nom de Retrovir® et il peut entrer dans la composition d'autres médicaments (Larder, Darby et al., 1989).

- **Les analogues non nucléosidiques (INNRT)**

D'autres inhibiteurs non nucléosidiques sont également développés, notamment pour contourner le processus de phosphorylation requis pour les analogues nucléosidiques. Leur mode d'action est différent de ces derniers. Ils inhibent la transcriptase inverse en interagissant directement avec elle. Ces inhibiteurs regroupent une trentaine de classe de molécules chimiques (De Corte, 2005).

### **7-1-2 Intégration**

Cette étape est également très importante pour le virus. Contrairement aux autres inhibiteurs, les inhibiteurs de l'intégrase agissent indirectement en chélatant le magnésium qui est indispensable à l'activité de l'enzyme (Grinsztejn, Nguyen et al., 2007).

### **7-1-3 La fusion**

Cette classe de molécules bloque par inhibition compétitive la fusion de la membrane du VIH-1 avec la membrane de la cellule cible. Le seul médicament actuellement commercialisé est l'Enfuvirtide (T20, Fuzéon®) qui s'administre par voie sous-cutanée. Il se lie à la gp41 de l'enveloppe virale et bloque la fusion du virus avec la membrane cellulaire. Son efficacité a été démontrée chez des patients en multi-échec thérapeutique. Sa tolérance est bonne, mis à part l'apparition de nodules sous-cutanés au niveau des points d'injection et le risque accru de pneumopathie bactérienne (Chaix & Goujard, 2009).

### **7-1-4 Maturation**

De nombreux travaux ont étudié la protéase virale du VIH-1. Son activité est essentielle pour la réplication du VIH-1, c'est elle qui permet la maturation des différentes protéines du virus. Ces inhibiteurs de la protéase agissent pour la plupart par compétition en présentant une séquence analogue au substrat naturel mais comprenant un acide aminé non hydrolysable (Hostetler, Richman et al., 1994).

## **7-2 Approche utilisant les ARN interférent**

L'ARN d'interférence constitue aujourd'hui un puissant outil pour analyser les fonctions des gènes. Elle permet en effet d'inhiber sélectivement l'expression d'un gène cible en dégradant de

façon séquence spécifique le transcrit correspondant, sans affecter l'expression d'autres gènes. L'interférence aux ARNs, est largement employée en virologie pour étudier la fonction des gènes nécessaires à l'accomplissement du cycle viral. Cette technique peut également être utilisée pour étudier les interactions virus-cellule, en inhibant des ARNm codant pour des protéines cellulaires potentiellement impliquées dans le déroulement du cycle viral (exemples du virus de l'immunodéficience humaine VIH-1, du virus de l'hépatite C VHC et des Adénovirus). L'interférence à ARN représente donc un outil précieux pour la recherche de nouvelles cibles antivirales. Deux classes des petites molécules d'ARN ont été décrites comme étant des régulatrices post-transcriptionnel séquences spécifique: les ARNs interférents (ou siRNA) et les micro-ARNs (ou miRNA). Les ARN interférents, de 21 à 23 oligonucléotides non codants, sont produits à partir d'un double brin d'ARN qui est synthétisé *in vitro* ou *in vivo* à partir des virus ou des séquences répétitives introduites par génie génétique. Les siRNA artificiels peuvent être introduits par des techniques de transfection ou à l'aide de vecteurs comme les vecteurs Lentiviraux. Les applications des ARN interférents dans le domaine médical font l'objet de nombreux travaux dans des domaines variés incluant les antiviraux, les cancers, des maladies neurodégénératives ou de l'angiogenèse oculaire pathologique. Des résultats très encourageants ont été obtenus avec cette approche dans l'infection à VIH-1 en ciblant soit directement des gènes viraux tel que *Tat*, *Rev*, *Nef*, *Gag*, *Pol* ou des gènes cellulaires tel que *CD4* ou *CCR5*. Malheureusement cette promesse thérapeutique s'est vue atténuée récemment par les travaux montrant que le virus peut échapper à l'effet antivirale des siRNA par l'intermédiaire de la protéine Tat qui est capable de bloquer ce mécanisme en inhibant DICER (Campochiaro, 2006).

### **7-3 Approche immunologique**

La mise au point d'un vaccin efficace est un enjeu majeur dans la lutte contre le VIH-1. Depuis sa découverte, de nombreuses équipes ont essayé de stimuler le système immunitaire afin d'induire le développement d'une réponse immune neutralisante efficace sur le long terme. Plusieurs approches ont été testées en utilisant par exemple le virus inactivé. Une autre approche consiste à utiliser des protéines virales comme la gp120, Tat ou Nef comme antigènes pour stimuler le système immunitaire. Les approches utilisant des virus atténués, des vaccins ADN ou des vaccins peptidiques correspondants aux épitopes de neutralisation (Cazeaux, Bennasser et al., 2002). Malheureusement aucune de ces approches vaccinales n'a été en mesure de produire un vaccin efficace contre le VIH-1 *in vivo* (Moynier, Kavsan et al., 1998). Cependant, des résultats plus récents ont montré que même s'il y a protection, elle n'est pas conservée dans le temps, comme le démontre l'apparition de virus résistants. Ces anticorps reconnaissent, respectivement, le site de la gp120 impliqué dans

l'interaction avec CD4, un épitope glycanique de la gp120 et un domaine de la gp41 impliqué dans la fusion et qui n'est accessible qu'au moment de la phase transitoire au cours du mécanisme de fusion. C'est le cas notamment des anticorps monoclonaux b12, 2G12, et 2F5. (Amara, Villinger et al., 2001).

Tableau I: Molécules antirétrovirales inclus dans les traitements actuels (Tani, 2012).

Classe thérapeutique	Nom du produit
INRT	Combir (lamivudine/zidovine) Emtriva (amtricitabine) Epivir (lamivudine ou 3TC) Hivid (zalcitabine) Retrovir (zidovudine ou AZT) Trivizir (abacavir, lamivudine et zidovudine) Videx (didanosine ou DDL) Viread (tenofovir, disoproxil fumarate) Zerit (stavudine ou d4t) Ziagen (abacavir)
INNRT	Viramune (nevirapine) Sustiva (efavirenz) Rescriptor (delavirdine)
IP	Viracept (nelfinavir) Reyataz (atazanavir) Agenerase (amprenavir) Crixivan (indinavir) Saquinavir : Fortorase (formulation SGC) Invirase (formulation HGC) Kaletra (lopinavir/ritonavir) Lexiva (fosamprenavir) Norvir (ritonavir)

## Partie 02 : Biologie de l'assemblage du VIH-1

Au début de cette partie nous avons jugé utile de faire des rappels sur les phosphoinositides et le processus de myristoylation, deux facteurs biochimiques importants associés au processus d'assemblage du VIH-1.

### 1- Rappels

#### ● Les Phosphoinositides

Les phosphatidylinositol constituent une famille de lipides, typiquement, les phosphatidylinositols forment un constituant mineur de la face cytosolique des membranes cellulaires des eucaryotes, Cette molécule est composée d'un acide phosphatidique (deux acides gras estérifiant une molécule de glycérol, elle-même liée de façon covalente à un acide phosphorique) dont le groupement phosphate est associée à une molécule de *myo*-inositol (Le groupement phosphate donne à la molécule une charge négative à pH physiologique). Le phosphatidylinositol peut être phosphorylé pour former du phosphate de phosphatidylinositol (PI-4-P, appelé PIP dans un contexte proche ou informel), phosphatidylinositol bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) et phosphatidylinositol trisphosphate (PIP<sub>3</sub>). Tous les lipides à base de phosphatidylinositol sont connus sous le nom d'inositides, ou parfois de phosphoinositides. Les formes phosphatées du phosphatidylinositol (PI) sont appelées phosphoinositides et jouent un rôle important dans la signalisation des lipides, la signalisation cellulaire et le trafic membranaire voir Figure-4. Le cycle inositol peut être phosphorylé par une variété de kinases sur les positions trois, quatre et cinq groupes hydroxyle en sept combinaisons différentes. Cependant, les groupements hydroxyles deux et six ne sont généralement pas phosphorylés en raison de l'existence d'un encombrement stérique.

Les variantes des phosphoinositides suivants ont été trouvées chez les animaux:

#### - Phosphatidylinositol monophosphate

- Phosphatidylinositol 3-phosphate, aussi connu comme ptdIns3p ou PI(3)P.
- Phosphatidylinositol 4-phosphate, aussi connu comme ptdIns4p ou PI(4)P.
- Phosphatidylinositol 5-phosphate, aussi connu comme ptdIns5p ou PI(5)P.

#### - Phosphatidylinositol bisphosphates

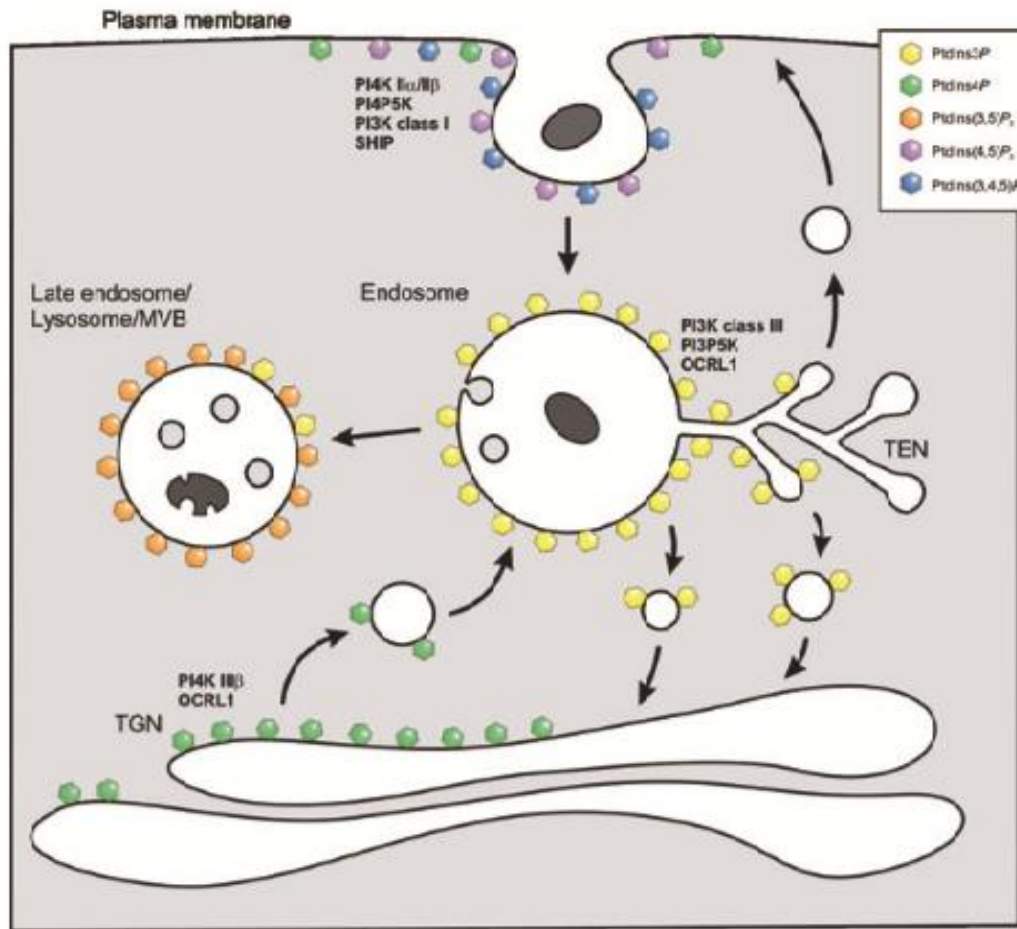
- Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphates, aussi connu comme ptdIns (3,4)P ou PI(3,4)P<sub>2</sub>.
- Phosphatidylinositol 3,5 bisphosphates, aussi connu comme ptdIns(3,5)P ou PI(3,5)P<sub>2</sub>.

-Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphates, aussi connu comme ptdIns(4,5) ou PI(4,5) P2. souvent simplement désigné PIP2 voir Figure-5.

**- Phosphatidyle inositol triphosphate**

-Phosphatidylinositol 1,4,5 triphosphate, aussi connu comme ptdIns(1,4,5).

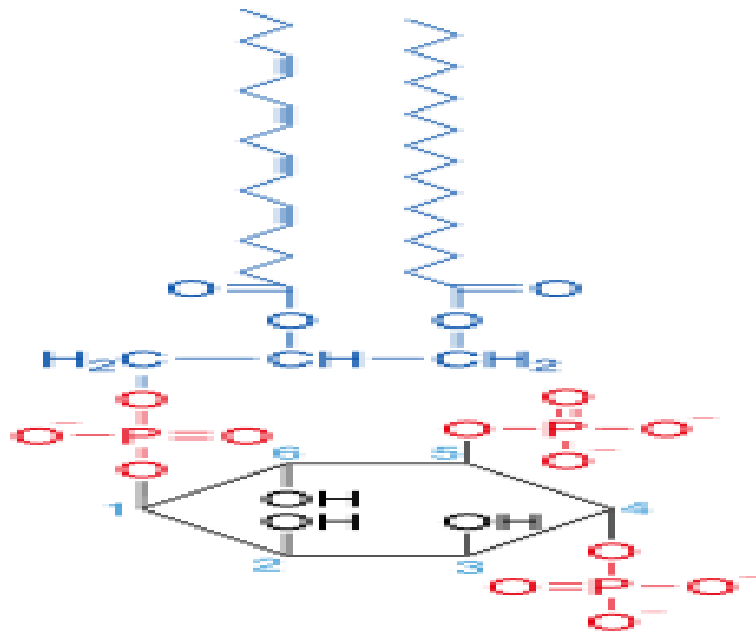
-Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate, aussi connu comme ptdIns(3,4,5).



**Figure-4:** Répartition subcellulaire des phosphoinositides et des enzymes du métabolisme des phosphoinositides dans les voies trafic de la membrane cellulaire (Weber, Ragaz et al., 2009). La membrane plasmique est enrichie en PI(4)P (Représenté en vert) et PI(4,5) P2 (Représenté en violet), produit par PI 4-kinase (PI4K)IIa / b et PI (4) P 5-kinase (PI4P5K) respectivement. Pour compléter la phagocytose, le PI (4,5) P2 est converti en PI (3,4,5) P3 (Représenté en bleu) par PI 3-kinases (PI3Ks) de classe I ou hydrolysé en PI (3,4) P2 par la 5-phosphatase SHIP. Les endosomes précoces et le réseau endosomique tubulaire (TEN) sont caractérisés par le PI (3) P (Représenté en jaune) produits par PI3K de classe III, qui est converti sur les corps multivesiculaires (MVBs), des endosomes tardifs et des lysosomes à PI(3,5) P2 (représenté en orange) par PI(3) P 5-kinase (PI3P5K). L'appareil de Golgi, les vésicules de sécrétion et le réticulum endoplasmique (ER) portent le PI (4) P, qui est produit dans le réseau trans-Golgi (TGN) de PI par PI4K IIIb et /ou PI (4,5) P2 par le 5-phosphatase OCRL1.

## Le phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P2)

Dans le cas des mammifères, la vie commence par l'hydrolyse du PI(4,5)P2 : un spermatozoïde fertilisant injecte en plus de son matériel génétique, une enzyme appelée la Phospholipase C (PLC), cette dernière hydrolyse le PI(4,5)P2 pour donner le diacylglycérol (DAG) et un inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3). Ce qui produit une d'oscillations de l'Ins (1,4,5) P3 et l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui augmente la fertilisation et initie l'activation de l'œuf, ce qui permet de lancer le développement embryonnaire. Dans les cellules adultes de mammifères, cette phosphorylation du PI(4,5)P2 produit le PI(3, 4,5) P3, qui agit comme un deuxième messenger et servant d'ancre membranaire pour plusieurs protéines cellulaire. La Figure-6 énumère les nombreuses fonctions du PI(4,5)P2 "phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate".

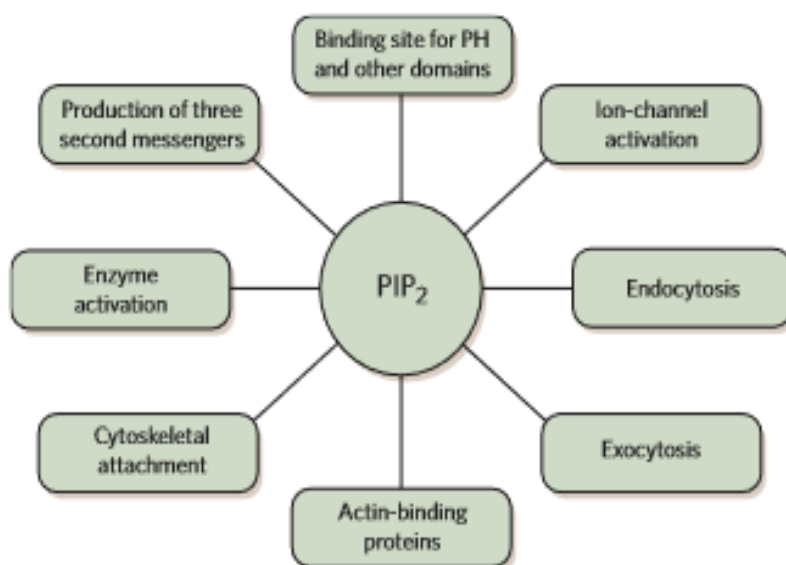


**Figure-5:** Structure du Phosphatidylinositol-(4,5)- bisphosphate. Le schéma représente la structure du phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate où le cycle inositide est entouré de 3 groupements phosphate en carbone (1,4,5) et de deux chaînes lipidiques.

Le PI(4,5)P2 lui-même ancre plusieurs protéines à la membrane plasmique via son interaction avec le domaine Pleckstrin homology (PH) et d'autres domaines structuraux connus. Il est capable d'activer de nombreux canaux ioniques situés sur la membrane plasmique. Le PI(4,5)P2 est requis pour l'endocytose ainsi que la phagocytose, ainsi que pour plusieurs étapes de l'exocytose et du trafic des vésicules synaptiques. En outre, de nombreuses protéines qui régulent l'actine se lient également

aux PI(4.5)P<sub>2</sub>, ce qui démontre que le PI(4.5)P<sub>2</sub> fonctionne comme un second messenger pour réguler l'adhésion cytosquelette-membrane plasmique.

Des études récentes ont montrées l'existence de plusieurs pools de PI(4.5)P<sub>2</sub> fonctionnelle au niveau de la membrane plasmique. C'est le cas de la présence de PI(4.5)P<sub>2</sub> dans des régions particulières de la membrane plasmique, comme les cônes de croissance des axones, les ruffles des fibroblastes et les phagosomes naissants des macrophages. La régulation de ces pools est assurée par la variation de la concentration du calcium intracellulaire (McLaughlin & Murray, 2005).



**Figure-6:** Schématisation des différentes fonctions du PI(4.5)P<sub>2</sub> (Wenk & De Camilli, 2004). Le PI(4.5)P<sub>2</sub> exerce plusieurs fonctions : Production de 3 second messengers, site de liaison au PH domaine et à d'autres domaines, activation de canaux ioniques, endocytose, exocytose, activation enzymatique, attachement du cytosquelette, site de liaison de l'actine.

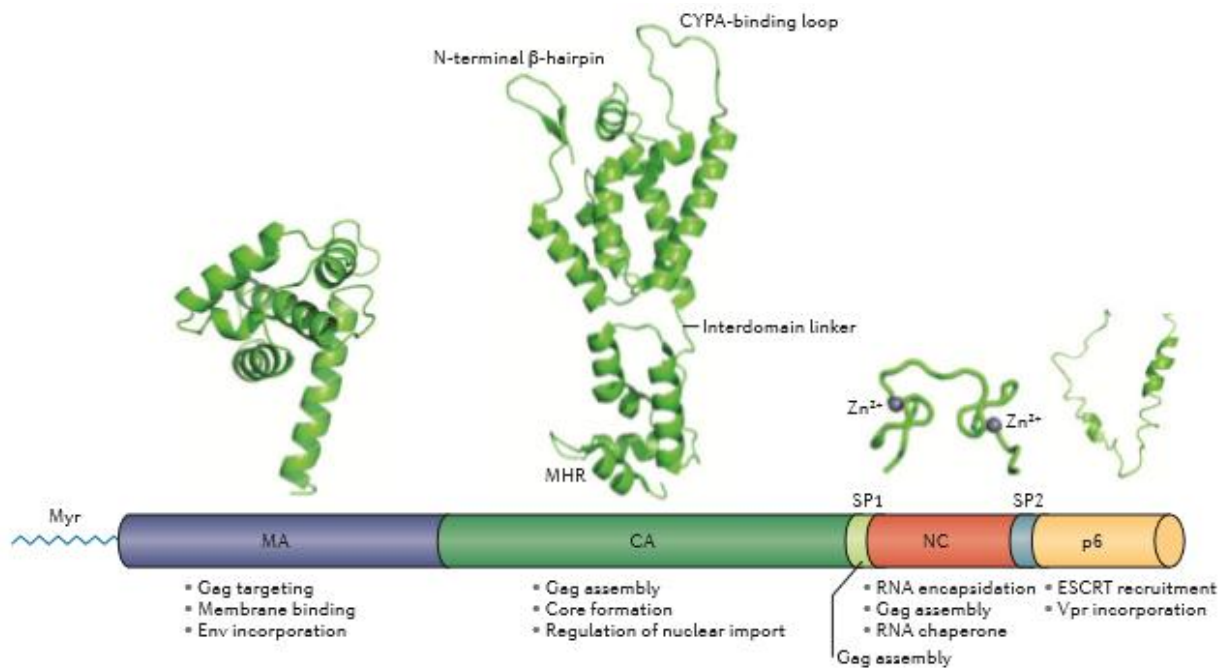
### ●La Myristoylation

C'est une modification post-traductionnelle des protéines qui correspond à une liaison covalente irréversible d'un acide gras saturé à 14-carbone (l'acide myristique) sur la Glycine N-terminale d'une protéine eucaryote ou virale. Elle est catalysée par l'enzyme N-myristoyltransferase (NMT). Ce processus est impliqué dans la direction et l'ancrage des protéines aux membranes cellulaires, par conséquent, impliqué dans la régulation cellulaire, la transduction du signal, la translocation, l'apoptose, ainsi que plusieurs processus pathologiques liés à des infections virales. Les substrats de NMT comprennent des protéines kinases telles que la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de CAMP (PK-A) et de la p60src, des phosphatases telles que la calcineurine B. Les

précurseurs de poly-protéine Gag d'un certain nombre de Rétrovirus (par exemple le VIH-I et le virus de la leucémie murine Moloney) ainsi que les protéines de la capsid de certains *Papovavirus* et *Picornavirus*. Beaucoup de ces protéines sont impliquées dans les cascades de signalisation (Gallo, 2012).

## **2- Rôles du précurseur Gag pr55 dans l'assemblage du virus**

Le précurseur pr55<sup>Gag</sup> joue un rôle majeur dans l'assemblage des particules virales. Pr55<sup>Gag</sup> est composé des protéines de la matrice (MA, p17), de la capsid (CA, p24), de la nucléocapsid (NC, p7) et des polypeptides P1, P2 et P6. Il permet le recrutement de l'ARN viral génomique, des protéines virales Gag, Pol et Env ainsi que des protéines cellulaires impliquées dans les processus d'assemblage et de bourgeonnement qui se déroule au niveau de la membrane plasmique. La protéine MA est responsable du ciblage et de l'attachement de Gag à la membrane plasmique de la cellule hôte. L'interaction de la protéine NC avec l'ARN viral simple brin de taille génomique permet son encapsidation. Enfin, la multimérisation des précurseurs Gag et Gag-Pol est facilité par un domaine localisé sur l'extrémité C-terminale de CA comme indiqué sur la Figure-7 (Bukrinskaya, 2004).



**Figure 7:** Schéma montrant la structure et fonctions de Gag (Freed, 2015). Les structures des principaux domaines de Gag, la matrice (MA), la capsid (CA), la nucléocapsid (NC) et le p6 - sont présentées sur une représentation linéaire du précurseur polyprotéine Gag. Les principales fonctions de chaque domaine Gag sont indiquées. MA (code PDB: 1HIW) est impliqué dans la localisation et la liaison à la membrane plasmique et l'incorporation de la glycoprotéine de l'enveloppe (Env). La liaison membranaire nécessite une myristoylation amino-terminale de MA. La CA (Code PDB: 2M8N), participe à l'assemblage de Gag, à la formation de la capsid sous forme sphérique et à la régulation de l'importation nucléaire de l'ADN viral. Le domaine N-terminal CA (CANTD) contient un feuillet  $\beta$  N-terminale et une boucle riche en proline qui lie la cyclophiline A (CYPA); Le peptide Spacer 1 (SP1) est impliqué dans l'assemblage de Gag. NC (code PDB: 1BJ6) contient deux domaines de doigts de zinc; Il participe à l'assemblage Gag et à l'encapsidation de l'ARN, et sert de chaperon d'ARNs. P6 (Code PDB: 2C55), est impliqué dans le recrutement du complexe de tri endosomal (ESCRT) nécessaire pour l'incorporation de Vpr.

## 2-1 MA

Le domaine MA de Gag joue un rôle important dans le déplacement du Gag vers les sites d'assemblage, qui sont le plus souvent situés sur la membrane plasmique. Les analyses structurales ont révélé que MA est composé principalement d'hélices- $\alpha$ , qui forment un noyau globulaire connecté au domaine CA par une hélice C-terminal. Le domaine MA subit une modification co-traductionnelle sur son extrémité N-terminale par ajout d'une chaîne myristate, cette liaison covalente du Myristate est essentielle pour l'association de Gag VIH-1 au feuillet interne de la membrane plasmique (Bryant & Ratner, 1990). Des mutations qui inhibent la myristoylation de Gag bloquent complètement l'assemblage du virus et sa libération en empêchant l'association de Gag avec la

membrane cellulaire. Resh et ses collègues ont proposé que la liaison de Gag-membrane est régie par un mécanisme à "myristoyl switch" (Zhou & Resh, 1996), dans lequel le myristate passe d'une conformation séquestrée à une autre forme exposée. Summers et ses collègues ont confirmé cette hypothèse par la méthode de résonance magnétique nucléaire (RMN) et ont démontré cette exposition myristate qui peut être promue par des facteurs qui augmentent l'auto-association de Gag. Les mutations au niveau de l'extrémité N-terminale de MA perturbent la liaison Gag-membrane apparemment en empêchant l'exposition du myristate de MA.

L'assemblage du VIH-1 se déroule sur des sites spécifiques constitué de micro-domaines riche en cholestérol et sphingolipides de la membrane plasmique appelé "**radeau lipidiques**". Les virions VIH-1 sont donc très enrichis en cholestérol et des lipides saturés dérivé de Raft.

Outre le myristate de N-terminal, l'association de Gag avec la membrane est également régulée par un groupe de résidus basique situés près du domaine N-terminale de MA (résidus 17-31). Ce domaine basique forme une surface riche en résidus chargé positivement du domaine MA. Des mutations de ces résidus basiques inhibent la liaison de Gag aux membranes des endosomes tardives ou au corps multivesiculaire (MVBs). Un certain nombre de protéines cellulaires dont leur association aux membranes est régulée par l'acylation en plus de la présence d'un groupe de résidus basique qui interagissent avec une classe spécifique de lipides chargés négativement que sont les phosphoinositides.

Certain membres de la famille des phosphoinositides se localisent sur des sites membranaires particulièrement au sein de certaines cellules et jouent un rôle important dans le déplacement de certaines protéines liées à des processus de signalisation. Par exemple le phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub>] est présent sur les feuillet interne de la membrane plasmique, phosphatidylinositol-(3,5)-bisphosphate [PI(3,5)P<sub>2</sub>] se concentre sur les endosomes tardifs et phosphatidylinositol-3-phosphate [PI(3)P] est le plus abondant sur les membranes endosomales précoces et sur les vésicules endosomales tardives. Le PI(4,5)P<sub>2</sub> joue un rôle important dans l'association de Gag avec la membrane plasmique. La sur-expression de 5-phosphatase IV, une enzyme qui converti le PI(4,5)P<sub>2</sub> en PI(4)P, induit l'appauvrissement de la membrane plasmique en PI(4,5)P<sub>2</sub> et repositionne Gag de la membrane plasmique vers les endosomes tardives/MVBs. Ces observations suggèrent que le PI(4,5)P<sub>2</sub> recrute Gag sur la membrane plasmique et permet la production des virions VIH-1, et que les résidus basiques dans MA sont directement impliqués dans ces interactions avec le PI(4,5)P<sub>2</sub> (Ono, Ablan et al., 2004).

Une interaction directe entre MA et PI(4,5)P2 a été démontrée par plusieurs groupes à l'aide de différentes approches. Summers et ses collègues ont utilisé la technique de spectroscopie RMN pour la résolution de la structure de la forme soluble du PI(4,5)P2 et MA. Cette interaction entraîne l'exposition accrue du myristate. Les données résolues par la technique de RMN montrent qu'en plus des interactions électrostatiques entre MA et PI(4,5)P2, la chaîne acyle du PI(4,5)P2 s'enfouit dans une poche hydrophobe située sur le noyau globulaire de MA.

L'entrée de la chaîne 2-acyle du PI(4,5)P2 dans la poche hydrophobe de MA pourrait promouvoir le repositionnement de Gag dans le microenvironnement de radeau lipidique, comme la chaîne 1-acyle saturée serait la seule PI(4,5)P2 située sur la membrane. Shkriabai et al ont montré que les Lys-29 et Lys-31 de MA sont importantes dans l'interaction MA-PI(4,5)P2 (Shkriabai, Datta et al., 2006).

Ces deux résidus basiques sont parmi ceux déjà démontrés être importants pour la localisation de Gag et du virus entier sur la membrane. Ono et ses collègues ont utilisé des essais de fixation aux liposomes pour montrer la liaison de Gag myristoylée aux vésicules contenant le PI(4,5)P2. La mutation des résidus 29 à 31 réduit fortement cette liaison (Chukkapalli, Hogue et al., 2008). Outre, la suppression de MA réduit de façon significative l'incorporation du PI(4,5)P2 dans les virions. Les interactions directes entre MA et PI(4,5)P2 ont également été rapportées dans le cas d'autres Rétrovirus, exemples: MLV (Murine Leukemia Virus) et EIAV (Equine Infectious Anemia Virus). Ces études démontrent qu'un large éventail de Rétrovirus exploite l'interaction MA-PI(4,5)P2 pour la liaison à la membrane pendant l'étape d'assemblage du virus. Dans le cas des EIAV, la liaison entre MA et PI(4,5)P2 peut réguler l'association de Gag avec la membrane plasmique (Fernandes, Chen et al., 2011).

En plus du rôle important du domaine MA dans la relocalisation de Gag du VIH-1 sur la membrane plasmique, il peut également servir à orienter l'incorporation de glycoprotéines Env dans les particules virales. Des études génétiques confirment l'existence d'une interaction directe entre la protéine MA et gp41 (Freed & Martin, 1995).

## **2-2 CA**

Comme c'est le cas du domaine MA, le domaine CA joue de multiples rôles dans le cycle de réplication du virus. Durant l'assemblage, la fonction de domaine CA de pr55<sup>Gag</sup> favorise l'interaction Gag-Gag qui permet la multimérisation de Gag. La protéine CA provenant de la

libération et le clivage de Gag55<sup>Gag</sup> avec la PR virale, joue un rôle majeur dans la maturation et l'assemblage viral aussi dans l'organisation de la capsid qui héberge l'ARN et les enzymes RT et IN.

Après l'entrée dans la cellule cible, le complexe central CA sert de cible pour les facteurs de restriction de l'hôte (exemple TRIM5α), CA est constitué de deux domaines indépendants, le N-terminal et C-terminal (NTD et CTD, respectivement). Le CA NTD et CTD sont reliés par un court linker flexible. Le NTD (résidus 1-145) est composé de 7 hélices-α (CA hélices 1-7) avec une boucle riche en proline qui relie les hélices 4 et 5, cette boucle interagit avec la cyclophiline A.

Le CTD (résidus 151-231) forme une hélice courte suivie d'un brin et quatre hélice-α (8-11). Le CA CTD a tendance à se dimériser et joue un rôle important dans la multimérisation de Gag lors de l'assemblage.

Les résidus de la région C-terminale de CA et N-terminal de SP1 sont également importants pour la formation des particules immatures, ce qui suggère que la région frontalière de CA/SP1 constitue un domaine critique pour l'assemblage.

## **2-3 NC**

Le domaine NC de Gag se caractérise par la présence de deux motifs en doigt de zinc flanqué de séquences basiques. Les doigts de zinc de NC sont parmi les séquences les plus conservées de la protéine Gag des Rétrovirus. Cette conservation est essentielle pour la fonction de NC. Le motif consensus de doigt de zinc des domaines NC est Cys-X2-Cys-X4-His-X4-Cys (CCHC). Le domaine NC de pr<sup>55Gag</sup>, sert à plusieurs fonctions essentielles lors du processus d'assemblage: entre autre il permet l'optimisation de l'interaction Gag-Gag.

En raison de ses capacités de liaison aux acides nucléiques, la NC dirige l'empaquetage du génome viral (2 copies d'ARNs) vers les particules virales. Elle favorise l'incorporation dans les virions des ARN<sup>t<sup>lys3</sup></sup>, qui sert d'amorces pour la transcriptase inverse lors du prochain cycle d'infection. En général, les résidus basiques de la NC sont responsables de l'activité de multimérisation de Gag. En raison de leur liaison non spécifique aux acides nucléiques. Gag-liant les acides nucléiques sert de plate-forme de multimérisation, qui a finalité de concentrer les molécules de Gag et faciliter leur assemblage. Par contre, l'encapsidation spécifique de l'ARN génomique virale implique l'interaction entre les doigts de zinc de NC et une structure multiples en tige-boucle de l'ARN, Gag sélectionne et achemine ces dimères d'ARN viral du cytoplasme. Après maturation de la pr<sup>55Gag</sup> suite à l'action de la PR, les protéines NC matures de 7 kDa fonctionne comme une

chaperonne des acides nucléiques pour accroître l'efficacité de la transcriptase inverse et de l'intégration dans le génome de l'hôte (Levin, Guo et al., 2005).

## **2-4 P6**

Le domaine P6 situé à l'extrémité C-terminale de Gag intervient à la fin du processus d'assemblage du virus pour promouvoir le bourgeonnement des particules virales à la surface des cellules. Une étude antérieure a montré que la suppression du domaine P6 de Gag du VIH-1 produit un blocage sévère de la production de particules virales. Des travaux ont identifié le motif Pro-Thr/Ser-Ala-Pro-[P(T/S)AP] fortement conservé dans P6 comme étant responsable de l'activité de bourgeonnement des virions. Des mutations d'un de ces résidus inhibent le bourgeonnement des virus comme le cas du phénotype observé lors de la suppression de P6 (Demirov, Orenstein et al., 2002b). Ces motifs ont été nommés 'late domains' en raison de leur rôle dans le bourgeonnement des virus. Trois classes de late domains ont été identifiés dans la protéine Gag de Rétrovirus : PT/SAP, PPXY et YP(X) L (où 'X' est un acide aminé et n=1-4 résidus). Dans de nombreux cas, les protéines Gag contiennent plusieurs late domains.

Dans le cas du VIH-1, le late domain principal est le PT/SAP, mais il existe un autre late domain secondaire de type YP(X) L se localise près de l'extrémité C-terminale de P6.

Les late domains interagissant directement avec les protéines de l'hôte qui font partie de la voie du transport endosomale. Au cœur de cette machinerie se trouvent plusieurs complexes multiprotéiques, qui sont appelés : Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) 0, I, II et III. Les complexes ESCRT jouent un rôle dans le transport vésiculaire (Wollert & Hurley, 2010). La machinerie ESCRT fonctionne aussi dans la réaction de scission de la membrane qui se produit au cours de la cytokinèse (Carlton & Martin-Serrano, 2007). Les rétrovirus ont donc évolué pour s'approprier cette machinerie cellulaire qui est redirigé pour accomplir le bourgeonnement et les processus d'assemblage viral sur la membrane.

Outre les quatre principaux complexes ESCRT 0, I, II, III, une variété de protéines accessoires ESCRT participe au fonctionnement de la machinerie 'ESCRT. Il s'agit d'Alix, une molécule qui possède des sites d'interaction avec ESCRT-I et ESCRT-III, AAA ATPase Vps4, et les membres de la famille Nedd4 d'ubiquitine ligases, qui interviennent dans l'ubiquitination des protéines transportées. Les late domains de Rétrovirus interagissent avec les différents composants de ce mécanisme de tri. Le motif de PT/SAP se lie au domaine de variante (UEV) ubiquitine E2 du

composant ESCRT-1 et Tsg101, les motifs YP(X)L interagissent avec la protéine Alix (Martin-Serrano, Yarovoy et al., 2003).

L'importance fonctionnelle des late domains du VIH-1 est d'établir des interactions directes avec la machinerie ESCRT. Plusieurs études ont démontrées que la perturbation de ces interactions est préjudiciable au bourgeonnement du VIH-1. Des études ont indiqué que la mutation du late domain principal du VIH-1: PT/SAP, conduit à la fixation permanente des virions sur la surface cellulaire (Huang, Orenstein et al., 1995). Par la suite, il a été démontré que la réduction de l'expression de Tsg101 avec des si-RNA altère la formation des virions (Demirov et al., 2002b).

### **3-Les sites d'assemblage du VIH-1**

Les protéines Gag nouvellement produites dans la cellule hôte se dirigent vers des sites cellulaires spécifiques à l'assemblage des virions. Des observations *in-vitro* montrent que la protéine Gag N-myristoylée se localise principalement aux niveaux des membranes cellulaires. Par conséquent, les destinations intracellulaires de Gag *in-vivo* incluent le feuillet interne de la membrane plasmique (PM) ainsi que les membranes d'autres organites intracellulaires. L'assemblage membranaire des particules virales permet une sécrétion rapide et efficace des virions, soit vers le milieu extracellulaire de la cellule, soit vers la cellule voisine via les synapses virologiques. Cependant, l'assemblage au niveau de la MP nécessite que les composants viraux traversent efficacement l'espace cytoplasmique fortement compartimentalisé et de ciblé avec précision la MP. D'autre part, dans les cellules qui sont des cibles à l'infection au VIH-1, tel que les lymphocytes T et les macrophages, leur assemblage s'effectuent au niveau des membranes des vésicules internes, les particules résultantes entrent dans la lumière des endosomes tardifs/corps multivesiculaires (LE/MVB) à partir desquels ils quittent la cellule en empruntant des processus cellulaires tels que la voie de sécrétion (exocytose). Il est bien établi que le bourgeonnement rétroviral nécessite l'apport de la machinerie ESCRT, dont les fonctions physiologiques est de faciliter le bourgeonnement des vésicules de sécrétion (Usami, Popov et al., 2009).

Des études de microscopie à fluorescence sur la lignée de cellules HEK 293T avait montré que Gag marqué avec la GFP est localisé sur la PM et par la suite semblait se déplacer vers des compartiments intracellulaires, alors que les expériences de pulsation ont détecté Gag naissant dans les compartiments MP et LE/MVB. Cependant, la perturbation du trafic de LE/MVB n'a affecté ni l'association Gag avec le PM ni la sortie du virus. Par conséquent, il semble que, au moins dans les cellules HEK, l'assemblage de virus est localisé sur la MP et contribue principalement à la production de particules productives (Joshi et al., 2009a).

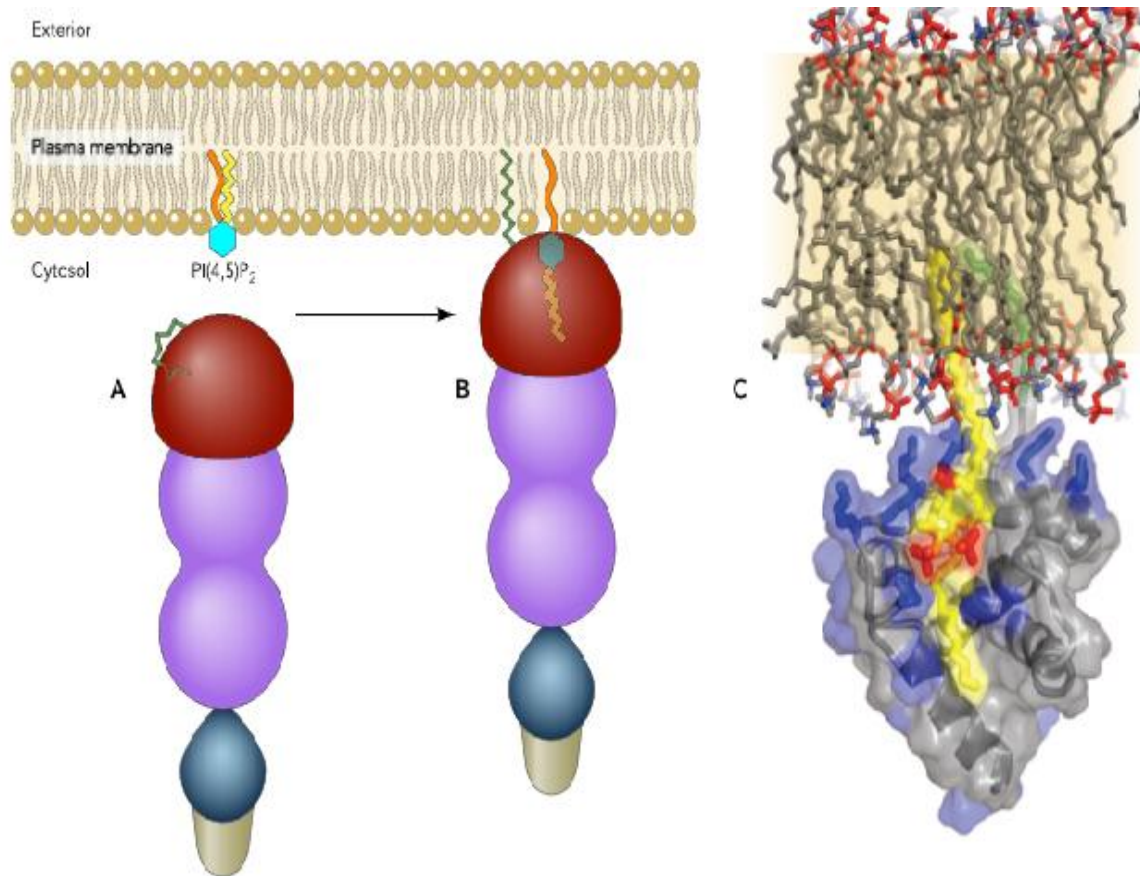
Ces études de microscopie à fluorescence indiquaient qu'une proportion significative de l'assemblage du VIH-1 dans les macrophages se produisait dans les compartiments intracellulaires portant des marqueurs LE/MVB tels que les tétraspanines. En effet, les virions libérés sont enrichis en plusieurs protéines issues de LE/MVB. Bien que l'assemblage et la libération du VIH-1 dans les lymphocytes T soit maintenant généralement accepté comme situé sur la MP, un travail récent a montré que les compartiments LE/MVB dans les cellules T et les macrophages peuvent, dans certaines circonstances, favoriser l'assemblage productif du VIH-1, exemple le cas d'un mutant Gag qui cible les MVB et libéré efficacement par les cellules primaires infectées. (Joshi et al., 2009a).

#### **4- Déplacement de Gag et localisation sur les sites d'assemblage**

Les radeaux lipidiques, également appelés «radeaux membranaires» sont des micro-domaines membranaires très dynamiques riches en cholestérol et sphingolipides, affichent une répartition asymétrique des protéines. Les données biochimiques et microscopiques montrent l'association de Gag sur les radeaux lipidiques et ces observations rapportent que la diminution du cholestérol réduit la quantité de Gag liée à la MP, ce qui perturbe la multimérisation Gag et entrave la production des virus. De plus, la composition lipidique de la membrane du VIH-1 ressemble fortement à celle des radeaux lipidiques et diffère de la MP de la cellule hôte ce qui reflète son origine des radeaux. Le Phosphoinositide cellulaire PI (4,5) P2, qui sert de déterminant critique au ciblage de Gag vers la MP et peut spécifiquement se localiser dans les radeaux lipidiques, qui est également concentré dans la membrane des virions. Les glycoprotéines Env sont également trouvées associées aux radeaux, apparemment au moins une partie en raison de leur association avec Gag, et que la queue cytoplasmique de gp41 permet l'association de Env avec les radeaux. L'association des protéines accessoires virales Nef et Vpu aux lipides Raft a également été rapportée (Ruiz, Hill et al., 2010).

Ce qui suggère que, dans certaines circonstances, Env peut influencer sur la localisation Gag. Gag synthétisé dans le cytosol, en principe, pourrait trafiquer en tant que monomères ou oligomères vers les membranes, où Gag subit une multimérisation pour amorcer l'assemblage de particules. L'identification de PI (4,5) P2 en tant que co-facteur cellulaire qui permet la localisation de Gag médiée par le MA sur la MP, et la caractérisation ultérieure de cette interaction fonctionnelle, a fournis des informations importantes pour la caractérisation du mécanisme d'adressage de Gag vers la membrane. La réduction du niveau cellulaires du PI(4,5) P2 sur la MP réduit l'efficacité de libération du virus et provoque l'accumulation des Gag sur les MVBs, un phénotype qui ressemble au comportement de Gag hébergeant des mutations dans la région hautement basique (HBR) de MA. *In vitro*, le fragment de myristate de la partie N-terminale de Gag est séquestré dans une poche hydrophobe. Cependant, deux événements déclencheurs, la multimérisation Gag et l'interaction entre

MA HBR avec le PI(4,5)P2 membranaire induisent un changement conformationnelle de MA qui expose le fragment myristate. Les résidus de MA Lys-29 et Lys-31 sont critiques pour cette interaction directe de MA et le PI (4,5) P2; Ces résidus basique jouent également un rôle important dans le ciblage intracellulaire de Gag, car la mutation de ces acides aminés redirige l'assemblage de Gag vers les MVBs. La chaîne myristate une fois exposée, s'insère dans la bicouche lipidique et stabilise ainsi l'interaction de Gag avec la membrane voir Figure-8 (Joshi et al., 2009a).



**Figure-8:** Schéma représentant l'association de Gag du VIH-1 avec le PI(4,5)P2 situé sur la MP (Balasubramaniam & Freed, 2011) A: le fragment d'acide myristique du NH2 de MA (vert) est représenté sous sa forme séquestrée, le PI (4,5) P2 incorporée dans le feuillet interne de la MP avec la chaînes acyle 1 = (orange) et 2 = (jaune). B: la liaison entre MA et PI (4,5) P2 conduit à l'introduction du fragment myristate dans une conformation exposée et son insertion ultérieure dans la bicouche lipidique, l'extrusion de la chaîne 2 = acyle de la bicouche lipidique et sa séquestration par MA. C: lors de la formation du complexe entre le VIH-1 MA et PI (4,5) P2, la 2-chaîne acyle non-saturée de PI (4,5) P2 (jaune) se lie à la poche hydrophobe de MA et Le groupe myristyle (vert) insert MA dans la bicouche lipidique.

## 5-Les facteurs cellulaires permettant l'assemblage de Gag

Le VIH-1 utilise une stratégie efficace pour produire des particules descendances dans lesquelles le précurseur Gag, est utilisé comme bloc de construction, qui est ensuite clivé par la PR à la fin de l'étape d'assemblage. Pr55Gag est nécessaire et suffisant pour orchestrer l'assemblage de particules,

car son expression seule dans les cellules eucaryotes appropriées conduit à la production de VLPs (virus like particles). Le fragment myristate NH<sub>2</sub>-terminal favorise la liaison à la membrane, et une région fortement basique (HBR) dans la MA, lie le phospholipide phosphatidylinositol- (4,5) - bisphosphate [PI (4,5) P<sub>2</sub>] du feuillet interne de la membrane plasmique (MP), stabilisant ainsi l'association Gag-membrane voir Figure-8. Par la suite, les domaines CA, SP1 et NC coopèrent pour promouvoir la multimérisation et l'assemblage Gag. L'interaction du domaine NC de Gag avec l'ARN viral, qui se produit initialement dans le cytosol, favorise la multimérisation de Gag. La particule d'assemblage incorpore le poly-protéine Pr160 Gag-Pol qui code pour les trois enzymes virales: RT, IN et PR. La coque de la protéine sphérique résultante induit la courbure de la MP et forme une structure en bourgeons tardifs. La membrane dérivée des cellules hôtes qui enveloppe les particules virales porte les glycoprotéines de l'enveloppe virales sous forme d'un complexe hétérotrimère de glycoprotéine gp120 et de gp41. Ces dernières sont dérivés du précurseur de glycoprotéine Env, gp160, qui est clivé par une protéase cellulaire de type furine pendant leur trafic à travers l'appareil de Golgi. Les motifs peptidiques courts dans Gag-p6, appelés «late domains» en raison de leur rôle dans la libération du virus, recrutent la machinerie cellulaires ESCRT (complexe de tri endosomique requis pour le transport), qui ont pour rôle la libération de vésicules endosomale pour médier la production de particules de virus. La coquille de Gag immature, dans laquelle les molécules Gag sont disposées radialement avec leurs extrémités NH<sub>2</sub> se trouve en contact avec la membrane et leurs extrémités COOH orientées vers le centre du virion. Elle est clivée parallèlement à la libération des particules par la PR virale. Un changement morphologique s'ensuit pour produire le virion infectieux mature, où MA reste associé à la membrane et les molécules CA forment le noyau conique de la capsid. Le noyau entoure le complexe ribo-nucléoprotéique, comprenant un dimère de l'ARN génomique viral en complexe avec la protéine NC et les enzymes virales RT et IN. Les virions libérés infectent une cellule cible et les protéines Gag matures, ainsi que d'autres cofacteurs viraux et cellulaires, dirigent les premiers événements du cycle de réplication.

Plusieurs études ont montrée le rôle des complexes de protéines adaptatrices hétéro-trimériques associées à la clathrine (AP), qui assurent le tri et le transport intracellulaire et du trafic de Gag vers les sites d'assemblage. Les membres du complexe AP opèrent selon des voies de transport distinctes telles que entre le réseau trans-Golgi (TGN) et les endosomes (AP-1), de la MP aux endosomes précoces (AP-2), du TGN et/ou des endosomes aux LE/MVB ( AP-3), et de TGN aux lysosomes (AP-4) (Ohno, 2006) . Il a été montré que la sous-unité AP-3 interagit directement avec la MA du VIH-1 et régule positivement la production des virions. Il a été montré également que AP-2 interagissait avec la région de jonction située entre MA et CA de Gag et régulait négativement la

production de particules virales. L'AP-2 lie également Env et induit son internalisation rapide à partir de la MP. Alors que Gag inhibe l'internalisation de Env à partir de la MP probablement en masquant les sites de liaison AP-2 de Env (Egan, Carruth et al., 1996). Un travail récent a permis de constater que les protéines GGA (Golgi-associated,  $\gamma$ -adaptin homologs, Arf-binding) et Arf (ADP-ribosylation factor) modulent l'assemblage et la libération du VIH-1. Les protéines GGA sont des adaptateurs au monomères de clathrines dépendants de Arf qui favorisent le tri des protéines dans les vésicules de transport destinées vers les endosomes, alors que les Arf GTPases circulent entre des formes inactives liées au PIB et activées par le GTP et régulent le trafic vestibulaire intracellulaire, le métabolisme des phospholipides et le remodelage de l'actine (Kahn, 2009). Le génome humain code pour trois protéines GGA et cinq protéines Arf. L'appauvrissement en GGA2 ou GGA3 améliore la libération de virus alors que la surexpression de l'une des protéines GGA perturbe l'association de Gag avec la membrane et inhibe la production de particules (Joshi, Nagashima et al., 2009b). En effet, cette perturbation des niveaux d'expression ou de l'activité de l'Arfs endogène altère l'interaction Gag-membrane et inhibe de manière significative les Rétrovirus, ce qui implique que les protéines Arf constituent des cofacteurs cellulaires critiques dans le trafic de Gag. Le rôle des membres de la famille des protéines Arf dans le trafic de Gag de VIH-1 reste encore mal défini (Joshi, Garg et al., 2008).

Le cytosquelette de la cellule hôte, composé de microtubules et de filaments d'actine, a longtemps été soupçonné d'être impliqué dans la délivrance de protéines virales aux sites d'assemblage de particules. Les microtubules sont les médiateurs du transport de longue portée dans la cellule et sont donc potentiellement adaptés à la livraison de composants viraux vers les sites d'assemblage comme la MP (Naghavi & Goff, 2007). Cependant, les détails moléculaires des mécanismes d'exploitation des systèmes cellulaires par rétrovirus durant les derniers événements de la réplication virale ne sont bien élucidés. Des résultats récents suggèrent que l'inhibition du remodelage des filaments d'actine et de la tubuline dans les lymphocytes T perturbe l'enrichissement de Gag et Env dans les domaines des radeaux lipidiques, ainsi que l'incorporation d'Env dans les virions, la libération de Gag, l'infectiosité virale (Jolly, Mitar et al., 2007). À l'inverse, la surexpression de Gag a été rapportée pour remodeler le cytosquelette d'actine au site de bourgeonnement de particules. Deux types de protéines liées aux microtubules avec des activités motrices opposées sont décrits ; Les kinésines facilitent le transport des molécules vers la périphérie des cellules, tandis que les dynéines favorisent le transport des molécules vers le centre d'organisation des microtubules perinucléaires (MTOC). Le membre de la superfamille kinésine KIF4 se lie à Gag VIH-1, favorise le trafic de Gag vers la MP, une réduction de l'expression de KIF4

diminue significativement la production des virus (Martinez, Xue et al., 2008). Des kinésines supplémentaires comme KIF3C et KIF3A sont également impliquées dans les événements tardifs de la réplication du VIH-1 et font partie du complexe kinesine-2 qui intervient dans le mouvement des endosomes tardifs/lysosomes vers la MP. En plus de la génération de particules virales localisées dans la MP, les résultats récents indiquent l'existence d'une voie alternative qui dépend du trafic endosomal de l'ARNv et Gag. Un rôle de la fonction motrice de la dynéine dans cette voie de transport intracellulaire a été suggéré (Lehmann, Milev et al., 2009).

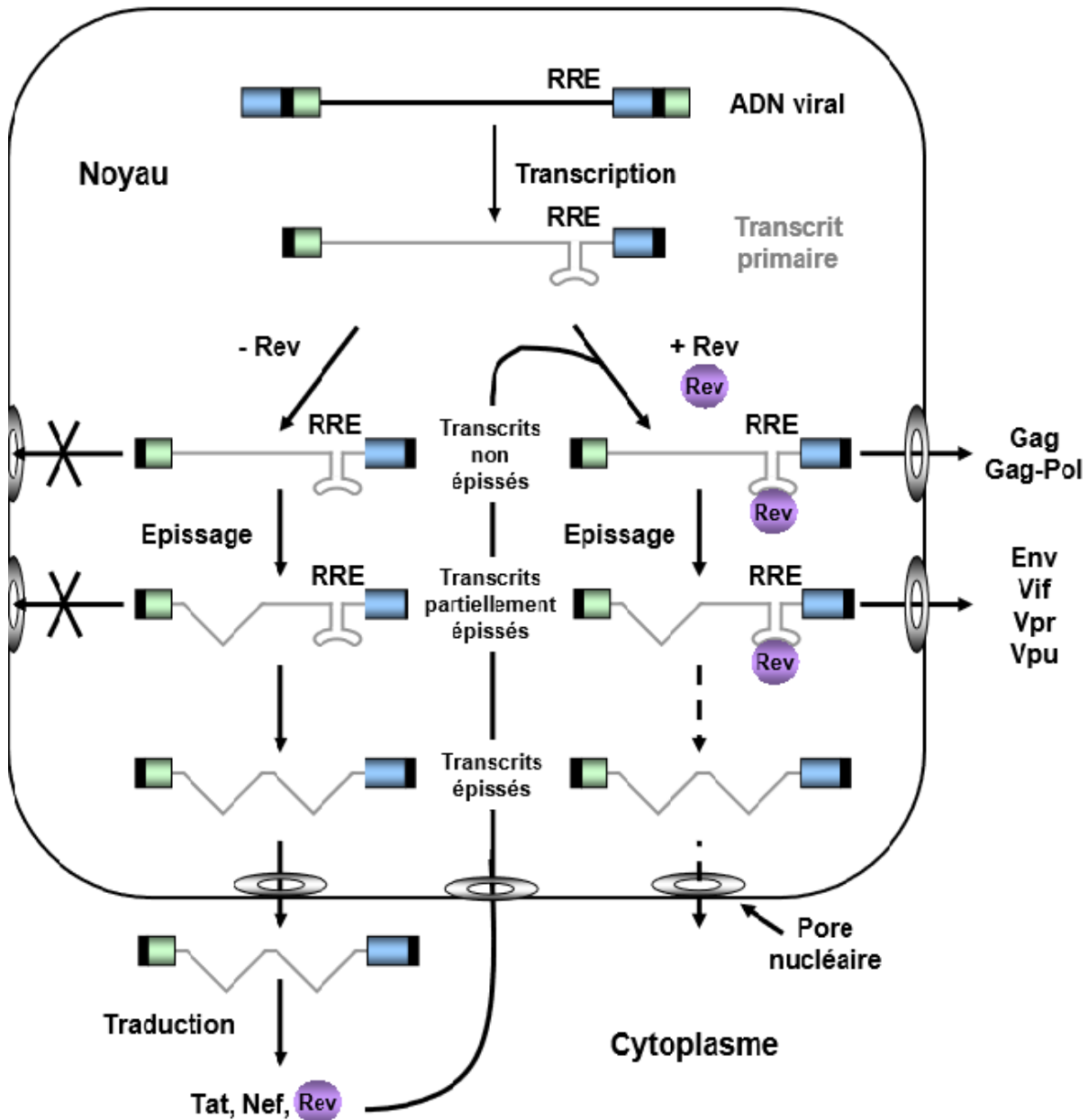
Les niveaux  $Ca^{+2}$  intracellulaire ont été supposés moduler le trafic et l'assemblage Gag du VIH-1. L'annexine 2 (Anx2), une protéine calcium dépendante, se lie à Gag et se retrouve dans les virions de VIH-1. Le rôle fonctionnel d'Anx2 lors de la réplication du VIH-1 est actuellement peu claire, tandis que le rôle cellulaire typique d'Anx2 est la modulation de l'infectiosité du VIH-1 (Rai, Mosoian et al., 2010). La stimulation de l'IP3R [inositol (1,4,5) -triphosphate], qui conduit à la libération du stock intracellulaire de  $Ca^{+2}$ , ont été rapporté pouvoir influencer sur l'accumulation de Gag à la MP et la libération du virus (Ehrlich, Medina et al., 2010).

Dans plusieurs lignées cellulaires (cellules T, macrophages et cellules dendritiques), Gag a été observé se concentrer sur les points de contact cellule-cellule. Ces zones de contact sont appelées synapses virologiques, par analogie avec des structures similaires – Synapses immunologiques - qui se forment entre les cellules présentatrices d'antigène et les cellules T. La synapse virologique du VIH-1 se caractérise par la polarisation du cytosquelette d'actine et par l'accumulation des récepteurs CD4, et des corécepteurs du VIH-1 (CXCR4 et CCR5), de molécules d'adhésion et de tétraspanines, en plus des glycoprotéines Gag et Env. Parce que le transfert d'une cellule à une autre a été observé depuis longtemps, le trafic de la synapse virologique à des implications profondes pour la réplication du VIH-1 *in vivo*. Dans les macrophages, les particules virales semblent s'assembler dans les compartiments internes. Dans les cellules dendritiques, on pense que le virus se lie à la surface de la cellule. Ces particules pré-assemblées se déplacent alors vers la jonction cellule-cellule après la formation des synapses, ce qui permet d'effectuer un transfert effectif cellule-cellule. Dans les cellules T, Gag semble trafiqué directement à la synapse où l'assemblage peut être favorisé. Les signaux qui régulent le mouvement de Gag à la synapse restent à définir, bien qu'il soit noté que les synapses sont riches en radeaux lipidiques. Il est clair que le trafic de Gag vers le site d'assemblage du virus dépend du type de la cellule infectée et des interactions cellule-cellule, et peuvent également être modulés par la densité cellulaire ainsi que d'autres facteurs. De telles variables peuvent également influencer sur le rôle des facteurs de l'hôte dans l'assemblage du virus (Jolly et al., 2007).

Ces considérations peuvent expliquer en partie certaines divergences observées entre différentes études.

## **6-Le rôle de la voie d'exportation d'ARN viral dans le déplacement de Gag lors de l'assemblage**

Des résultats récents suggèrent que les trajets de l'ARN viral du noyau vers le cytoplasme peut influencer l'itinéraire de Gag et moduler l'efficacité de l'assemblage. Les ARNm non-épissés ou partiellement épissés ne sont pas recrutés par les adaptateurs d'export d'ARNm du noyau. Au lieu de cela, le virus utilise une de ses protéines accessoires, Rev, qui se lie sur une séquence de l'ARNv appelé l'élément de réponse Rev (RRE) et le récepteur d'export nucléaire Crm1, pour permettre l'export nucléaire de ces ARN viraux comme le montre la Figure-9. Le remplacement du RRE de VIH-1 par l'élément régulateur post-transcriptionnel du virus de l'hépatite B (PRE) a donné des niveaux d'expression comparables de la protéine Gag mais diminue l'efficacité de bourgeonnement de 10 fois. La MA semble perturber la localisation et l'assemblage de Gag sur la membrane, quand elle est synthétisée à partir d'un ARNm qui est transporté hors du noyau via un mécanisme indépendant de Rev. Remarquablement, le rôle de la voie d'export de l'ARN viral sur l'assemblage semble également être dépendant du type cellulaire. Par exemple, Gag exprimé dans certaines lignées de cellules de rongeurs est incompatible avec l'assemblage. Cependant, le remplacement de la séquence RRE de l'ARNv par l'élément de transport constitutif (CTE) du virus du singe de Mason-Pfizer, qui interagit directement avec le facteur d'export nucléaire NXF1 permet l'assemblage (Lehmann et al., 2009). Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer l'influence de la voie d'export d'ARN viraux sur le ciblage et l'assemblage de Gag dirigé par MA. L'une de ces hypothèses stipule que la séquestration du myristate et la liaison à l'ARN peuvent empêcher Gag de s'associer avec les membranes jusqu'à ce qu'elle atteigne la MP, où la MA lie PI(4,5) P2, déplaçant ainsi l'ARN viral lié et déclenchant l'exposition du myristate pour stabiliser la liaison de Gag à la MP. L'ARN viral déplacé pourrait alors servir d'échafaudage pour la multimérisation et l'assemblage de particules Gag dépendante de la NC (Chukkapalli, Oh et al., 2010).



**Figure-9:** Schéma de la régulation par Rev de l'export nucléaire des transcrits viraux vers le cytoplasme (Cullen, 2003). La protéine Rev permet le transit des transcrits viraux non épissés ou partiellement épissés ou par les pores nucléaires via son interaction avec la séquence RRE. Les ARNm codant les protéines Tat, Rev et Nef sont des transcrits totalement épissés, ils ne requièrent donc pas la présence Rev pour être exportés vers le cytoplasme. En conséquence, Tat, Rev et Nef sont les premières protéines virales à être synthétisées. Lorsque la quantité de protéine Rev atteint un seuil critique, Rev favorise l'export des ARNm viraux partiellement ou non épissés. Les précurseurs protéiques Gag et Gag-pol et les protéines Env, Vif, Vpr et Vpu sont alors synthétisés.

## **7- Biosynthèse, maturation, transport et incorporation des glycoprotéines de l'enveloppe "gp160"**

Le précurseur Env : gp160 des glycoprotéines de l'enveloppe est synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique granuleux puis transporté dans le réticulum endoplasmique lisse grâce à son peptide signal. Le précurseur gp160 subit ensuite plusieurs modifications : N-glycosylation, formation de ponts disulfures, repliement et oligomérisation. Le précurseur gp160 est transporté à la surface cellulaire par la machinerie de sécrétion. Le clivage du précurseur gp160 en gp120-gp41 s'effectue dans l'appareil de Golgi par des endo-protéases cellulaires de type furines. Les glycoprotéines d'enveloppe sont ensuite incorporées dans la particule virale via des interactions entre le domaine intra-cytoplasmique de la gp41 et la partie N-terminale de la protéine MA (Freed, 2015).

## **8- Incorporation des protéines virales et cellulaires**

Les protéines auxiliaires Vpr et Vif sont incorporées dans les virions : Vpr via une interaction avec p6 et Vif via des interactions avec Gag pr55 et l'ARN viral. La Cyp-A est incorporée dans les virions par une interaction avec la protéine CA et permet d'augmenter l'infectivité du virus après son entrée dans la cellule hôte. Plusieurs autres protéines cellulaires sont impliquées dans les étapes tardives du cycle viral. Notamment, la protéine HP 68, une protéine fixant l'ATP identifiée précédemment comme un inhibiteur de la RNase L [Ribonuclease L ou bien RNase L (latent)], est associée aux protéines Gag et Vif et favorise l'assemblage des particules virales immatures (Zimmerman, Klein et al., 2002).

## **9- Protéines cellulaires de l'hôte incorporées par le VIH-1**

Tout comme la majorité des virus enveloppés, le VIH-1 est entouré d'une bicouche lipidique empruntée de la membrane cytoplasmique de l'hôte lors du processus de bourgeonnement. Outre des protéines virales de l'enveloppe, gp120 et gp41, on retrouve à la surface des virions une grande variété de protéines qui proviennent de la cellule productrice listées sur le Tableau-II (Tremblay, 2001).

**Tableau II:** Protéines cellulaires incorporées sur les virions VIH-1 (Tremblay, Fortin et al., 1998).

Les molécules	Rôle
CYPA (cyclophiline A)	Défense immunitaire, servant de couverture au VIH-11)
HP68 (protéine humain)	Fixation l'ATP comme inhibiteur RNase-L
Tsg 101 (Tumor susceptibilitaty gène 101)	Croissance et différenciation des cellules et agit comme régulateur de croissance négative
Hsp70 (heat shock protéine 70)	Rôle chaperonne
AIP1 (Apoptosis-linked gène 2 interacting protéine 1)	Inhibiteur puissant de la libération des virions avec le recrutement de ESCRT-III)
ICAM-1	Molécules d'adhésion
CMH-II (Complexes majeur d'histocompatibilité	Système de reconnaissance du soi
HLA-DR	Marqueur d'activité
CD154	Activation des cellules présentatrice d'antigène
TIP47	Rôle dans l'incorporation (recrute Env)
CD45 (tyrosine kinase de surface)	Protéiné tyrosine phosphatase transmembranaire
Thy-1	Lie le GPI (glycosylphosphatidylinositol)
EGFR	Facteur de croissance dermique
LFA-1	Favorise l'attachement VIH-1 au cellule dendritique
gp150	Dans l'incorporation viral (Gène Env code pour précurseur 160kd gp160 pour VIH-1 et gp150 pour VIH-2)
CD25 (Tac)	Déecté chez les patient traité avec IL-2
CD59	Inhibiteur de MAC
CD71	Récepteur de la transferrine
HLA-DP et DQ	Sont des molécules de classe II rend la molécule plus infectieuse

## 10-Bourgeonnement et maturation des particules virales

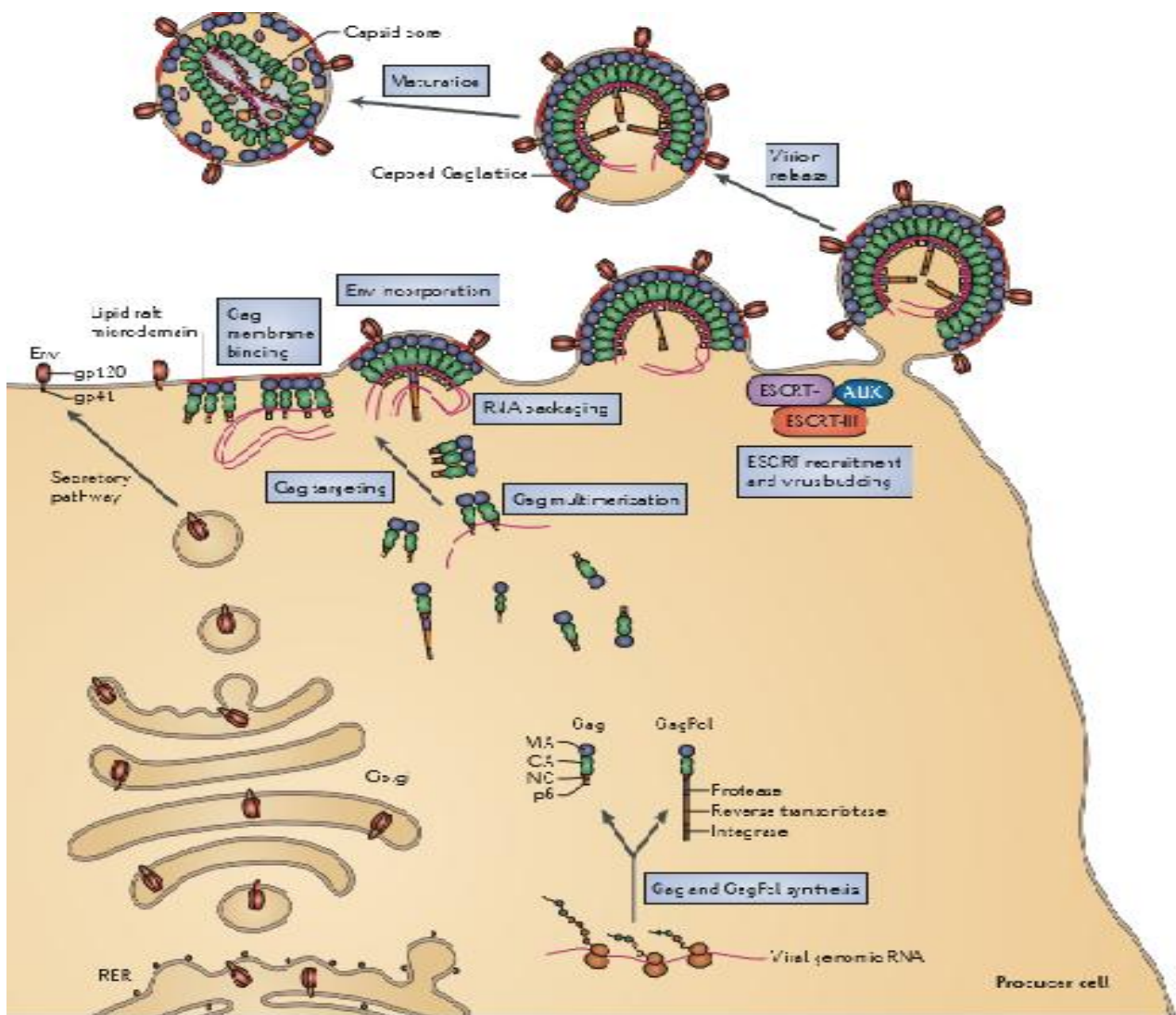
Le processus de bourgeonnement représente le second évènement de fusion membranaire Permettant au virus de compléter son cycle viral voir Figure-10.

La production de particules VIH-1 est pilotée par le précurseur poly-protéine Pr55<sup>Gag</sup> (qui est dénommé Gag), chaque domaine de Gag est impliqué dans un des processus d'assemblage et de libération. Le domaine MA oriente Pr55<sup>Gag</sup> à la membrane plasmique de la cellule hôte où il ancre Gag au feuillet interne de la bicouche lipidique. Le domaine CA avec SP1 et NC servent à la multimérisation de Gag et promouvoir l'assemblage de particules virales. Le domaine NC qui est lié également à l'ARN génomique viral, facilite l'empaquetage de deux copies de l'ARN génomique viral dans chaque particule du virus. Le domaine C-terminal de P6 contient des motifs appelés 'late domains', interagissent avec la machinerie cellulaire ESCRT pour promouvoir l'assemblage et la libération des virions de la surface cellulaire Figure-10. Le clivage des Pr55<sup>Gag</sup> par le PR permet la maturation du virion pendant le processus d'assemblage, un certain nombre de facteurs cellulaires

sont aussi incorporés dans les virions. Il a été signalé qu'environ 250 protéines cellulaires sont incorporées dans les virions VIH-1 produits des macrophages et monocytes. Dans la plupart des cas, l'importance fonctionnelle de ces protéines de l'hôte associée aux virions reste à établir (Demirov & Freed, 2004).

Les particules virales immatures sont composées d'environ 5000 molécules de Gag qui s'organisent pour former une coque protéique de forme sphérique. Les analyses de microscopie cryoélectronique (EM) ont montrés que ces molécules Gag sont en forme de bâtonnet organisé dans les particules immatures côte à côte de façon radiale, avec un domaine N-terminal MA associé à la membrane et la portion C-terminale de Gag orienté vers le centre de la particule. Dans les particules virales immatures, les molécules Gag forment en continu des formes hexamériques incomplètes.

Le motif PTAP (Pro-Thr-Ala-Pro) situé sur le domaine P6 du précurseur Gag joue un rôle crucial dans le bourgeonnement des particules virales. La voie de transport vésiculaire est impliquée dans le bourgeonnement. Les complexes ESCRT «Endosomal Sorting Complex Required for Transport» acheminent les protéines des compartiments de biosynthèse ou d'endocytose vers les corps multi-vésiculaires (MVB, «Multivesicular Body») puis vers les lysosomes. L'interaction de la protéine P6 avec un des composants du complexe ESCRT-1, la protéine Tsg101 « Tumor susceptibility gène 101 », est nécessaire à un bourgeonnement efficace. De même, l'ATPase AAA Vps4 « ATPase Associated with cellular Activities Vacuolar Protein Sorting protein 4 » est impliquée dans le bourgeonnement. Enfin, la protéine P6 interagit également avec AIP « Apoptosis-Linked Gene 2 Interacting Protein 1 » qui agit comme connecteur entre ESCRT-I et ESCRT-III dans les cellules en s'associant avec Tsg101. La fixation directe de P6 à AIP-1 ou à des complexes AIP-1/Tsg101 conduit au recrutement de ESCRT-III au niveau du site de bourgeonnement. Ainsi, le recrutement des complexes ESCRT par le précurseur Gag sur la membrane plasmique favorise le bourgeonnement du virus. Les précurseurs Gag sont associés avec les radeaux lipidiques ; qui ont été décrits comme les plateformes d'assemblage et de bourgeonnement de plusieurs virus enveloppés, dont le VIH-1 (Briggs, Riches et al., 2009).



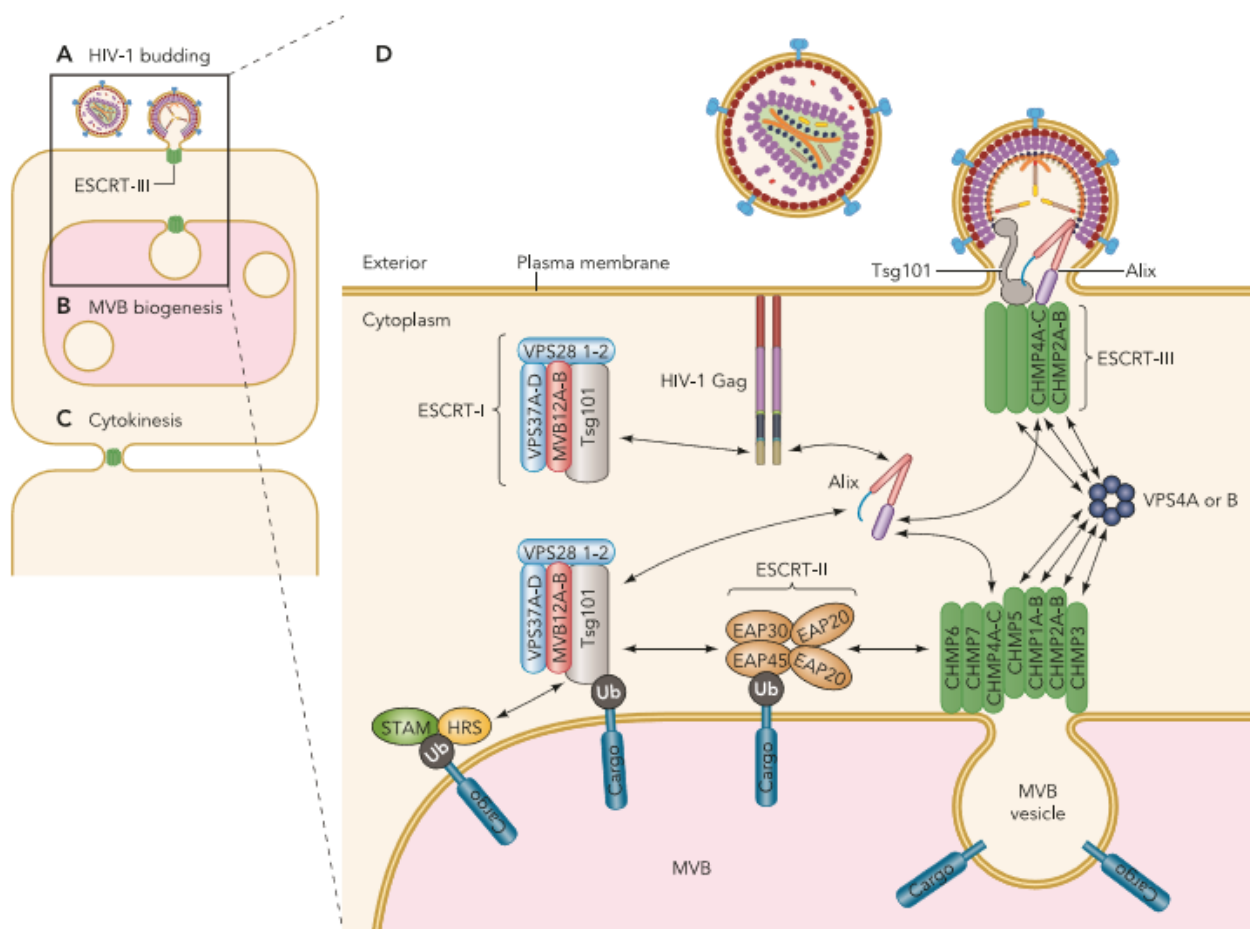
**Figure-10:** Schéma représentant les stades tardifs du cycle de réplication du VIH-1 (Freed, 2015). Les glycoprotéines de l'enveloppe virale (Env) traversent la voie de sécrétion, du réticulum endoplasmique rugueux (RER) au Golgi, puis dans des vésicules jusqu'à l'arrivée à la membrane plasmique. La polyprotéine précurseur Gag - qui contient la matrice (MA), la capside (CA), la nucléocapside (NC) et les domaines P6 - est synthétisée dans le cytosol à partir de l'ARN viral complet. Le précurseur de polyprotéine GagPol - qui contient des domaines MA, CA, NC, protéase, transcriptase inverse et intégrase - est synthétisée à la suite d'un événement de changement de cadre de lecture lors de la traduction de l'ARN viral codant pour Gag. Gag recrute l'ARNv génomique, commence à se multimériser et atteint la membrane plasmique par une voie encore non définie. Gag est ancré à la membrane plasmique dans des microdomaines de radeaux lipidiques par l'insertion de son myristate N-terminal dans la bicouche lipidique et par des interactions directes avec le phospholipidum phosphatidylinositol- (4,5)-bisphosphate. La particule assemblée incorpore Env et recrute ensuite un complexe de tri endosomal I (ESCRT-I) via une association directe entre le motif PT/SAP dans P6 et la sous-unité du récepteur tumoral 101 (TSG101) de ESCRT-I. Gag s'engage également dans la liaison directe avec la protéine X (ALIX) interagissant avec le facteur ESCRT, principalement à travers le motif YPXL de P6. Au fur et à mesure de l'avancement, les complexes ESCRT-III et la protéine de tri vacuolaires 4 (VPS4) sont recrutés et entraînent la réaction de scission de la membrane qui conduit à la libération des particules. La maturation, conduit à la formation du noyau conique de la capside, déclenchée par un clivage protéolytique des précurseurs de polyprotéines Gag et GagPol par la protéase virale PR.

## 11- Libération des particules virales du VIH-1

Le VIH-1 s'approprié la machinerie ESCRT pour pouvoir sortir de la cellule, et une quelconque défaillance induit la rétention de particules virales immatures au niveau de la membrane. Le système ESCRT est également impliqué dans la biogenèse des MVB, la cytokinèse et l'autophagie (Rusten & Stenmark, 2009). Le noyau de l'appareil ESCRT comprend quatre complexes multi-protéines, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III et plusieurs facteurs accessoires ESCRT, y compris Alix et l'AAP ATPase Vps4. Les récentes études *in vitro* effectuées sur des vésicules géantes unilamellaires suggèrent que les ESCRT-I et -II sont essentielles à la formation de bourgeons, alors que ESCRT-III est le principal acteur de la médiation de la scission de la membrane. Vps4 à son tour est nécessaire dans les cellules pour le recyclage de la machinerie ESCRT. Le domaine P6 du VIH-1 abrite deux late domains: le Late domaine principal consiste en la séquence peptidique Pro-Thr / Ser-Ala-Pro [PT/SAP] qui interagit avec le composant ESCRT-1 et Tsg101; Le second late domain, Tyr-Pro-Xn-Leu (YPXnL, où X est un acide aminé quelconque) se lie à la protéine adaptatrice Alix. Par la suite, Tsg101 et Alix recrutent et activent ESCRT-III et Vps4. La down-régulation de l'expression de Tsg101 à l'aide de siRNA ou en surexprimant un dominant négatif de Tsg101 bloque totalement la production du virus (Demirov, Ono et al., 2002a). Le VIH-1 semble donc utiliser principalement la voie PT/SAP-Tsg101 pour recruter le système ESCRT. Il est maintenant connu que la scission de la membrane est médiée par la formation d'anneaux concentriques de composants ESCRT-III qui se contraignent et finissent par le bourgeonnement (Fujii, Hurley et al., 2007) comme illustré sur la Figure-11.

Des résultats récents ont révélé des mécanismes médiés par les cellules hôtes "restreignent" la libération de virions matures provenant de la surface cellulaire. On sait depuis un certain temps que les virions de VIH-1 produits en l'absence de la protéine accessoire virale Vpu restent attachés à la surface cellulaire. En l'absence de Vpu, les virions arrivent à maturité et reste bloqués sur la surface des cellules, le traitement par la protéase (PR) peut déclencher la libération de ces virus. Une protéine cellulaire, identifiée comme l'agent causal de ce phénomène a été renommée "Tetherine". L'expression de la Tetherine est induite par le traitement avec de l'interféron, ce qui suggère qu'elle est une composante du mécanisme de défense cellulaire antiviral. En plus de restreindre la libération et la propagation du VIH-1 infectieux, la BST-2/Tetherine présente une activité de rétention membranaire comparable au cas de nombreux virus enveloppés. Pour se protéger contre la Tetherine les virus comme le cas du VIH-1 codent pour des facteurs antitetherines qui fonctionnent par des mécanismes distincts. Actuellement, on suggère que la BST-2 / Tetherine exerce son activité de restriction en reliant simplement la membrane virale à la membrane cellulaire hôte, en bloquant ainsi

les virions sur la surface de la cellule. De nombreuses études sont en cours pour mieux élucider les mécanismes d'action de Vpu pour antagoniser l'effet de BST-2/Tetherine (Neil, Zang et al., 2008).



**Figure-11:** Représentation schématique du rôle du complexe ESCRT dans la libération du VIH-1 (Fujii et al., 2007). (A), de la biogenèse (B) de MVB et de la cytokinèse (C). D: les composants de la machine ESCRT impliqués dans la libération du VIH-1.

## 12- Maturation des particules virales

Les virions ayant bourgeonnés de la membrane plasmique de la cellule hôte ne sont pas infectieux et doivent subir une ultime étape de maturation. La maturation est réalisée grâce à la protéase virale (PR) qui va cliver les précurseurs Gag et Gag-Pol de façon séquentielle en protéines matures Gag (MA, CA, NC, p6) et Pol (PR, IN, RT). Le clivage protéolytique est une étape critique dans la morphogénèse du VIH-1 et permet le changement en forme conique du "Core viral". La maturation est la dernière étape du cycle de réplication du VIH-1 et est indispensable à la production de virus infectieux (Bukrinskaya, 2004).

## **Partie 03 : Thérapies en cours de développement ciblant l'étape d'assemblage du VIH-1**

### **1-Introduction**

L'assemblage et la libération des particules virales du VIH-1 sont médiés par le précurseur de polyprotéinique Gag. Gag est synthétisé dans le cytosol et se déplace rapidement vers la membrane pour organiser la production de particules du virus. La biologie cellulaire du déplacement Gag VIH-1 est actuellement l'un des aspects les moins décrits de la réplication du VIH-1. L'infection par le VIH-1 détruit les cellules T CD4+ par divers mécanismes, menant à un affaiblissement général du système immunitaire, à l'apparition d'infections opportunistes et, en fin de compte, à la mort de l'individu infecté. La stratégie de la réplication du VIH-1 permet une génération rapide de nouveaux variants viraux mutés résistant aux divers traitements. Pour limiter l'émergence de souches résistantes aux médicaments, un traitement antirétroviral hautement actif (HAART, Highly active antiretroviral therapy) qui implique un traitement simultané avec un cocktail d'antirétroviraux constitue actuellement le traitement le plus courant. Le traitement HAART arrive à prolonger la vie des sujets infectés mais présente souvent des effets indésirables dans une proportion significative de patients. De plus, la thérapie HAART n'élimine pas l'infection par le VIH-1 car un réservoir viral stable est conservé dans les cellules T CD4+ quiescentes (Dahl, Josefsson et al., 2010). Ainsi, il est urgent de développer de nouveaux anti-rétroviraux qui visent d'autres étapes cruciales supplémentaires du cycle de réplication du VIH-1. A ce jour, les stades tardifs du cycle de réplication du VIH-1, spécifiquement l'assemblage et la libération du virus, n'ont pas été exploités avec succès pour le développement de thérapie antivirale. La protéine structurelle virale majeure "Gag" coordonne l'assemblage et la libération des particules virales, et la production de particules infectieuses dépend essentiellement du trafic intracellulaire hautement régulé de Gag vers les sites d'assemblage appropriés (Adamson & Freed, 2007).

### **2-Gag: cible des thérapies antirétrovirales**

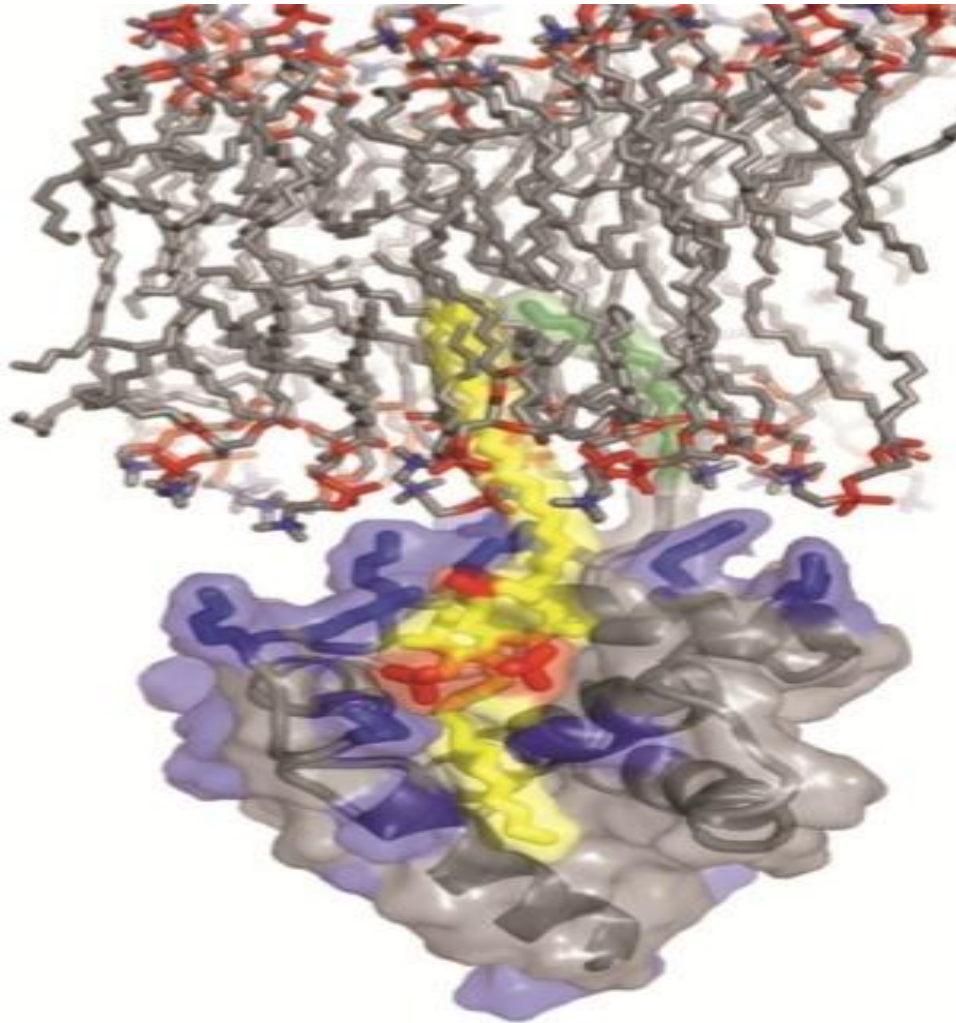
La voie de la production de particules du VIH-1 suit une série d'étapes distinctes qui inclut:

- 1) Adressage de Gag vers le site d'assemblage des virus VIH-1.
- 2) Liaison de Gag à la membrane cellulaire.
- 3) Interaction entre les monomères de Gag menant à sa multimérisation et formation de virions.

## Thérapies ciblant MA

En théorie une variété de stratégies susceptibles d'être appliquée pour le ciblage thérapeutique du domaine MA de Gag. Dans son état séquestré, la portion myristate attachée à l'extrémité N-terminale de MA sous forme empaqueté dans une poche hydrophobe sur le noyau globulaire de MA voir la structure rapportée dans Figure-12. L'association de Gag-membrane entraîne l'exposition de cette poche hydrophobe, qui intuitivement semble être susceptible à augmenter l'efficacité de l'assemblage de virus (Kiernan, Ono et al., 1998). Cependant, des mutations qui améliorent l'association membranaire ont été rapportées capable de perturber la réplication en induisant un défaut du cycle d'infection. La liaison PI(4,5)P2 à MA pourrait également être ciblée avec de petites molécules inhibitrices par compétition à l'association de MA-PI(4,5)P2. D'une manière intéressante, des études *in vitro* ont montrés que des dérivés solubles de PI(4,5)P2, peuvent empêcher la liaison de MA au PI(4,5)P2 et ainsi perturber son association avec la membrane sur des modèles de liposomes (Alfadhli, Still et al., 2009).

Cela soulève la possibilité que des petites molécules servant d'ancre membranaire homologue à la liaison au PI(4,5)P2, pourrait augmenter l'association Gag-membrane qui déclenche l'exposition du myristate. Cette dérégulation de la liaison membranaire pourrait perturber le bon ciblage de Gag de la MP et pouvant générer des particules non-infectieuses. Dans le cas où les sites d'interaction putatif entre MA et gp41 de Env peuvent être mieux définis, l'interaction MA-gp41 peut être aussi une cible intéressante en visant à désorganiser l'incorporation de Env dans les virions. L'association de Gag-lipides Raft peut être aussi développé comme cible. Enfin l'interaction MA-protéines de l'hôte pourrait être perturber via des stratégies pharmacologiques (Waheed & Freed, 2010).



**Figure-12:** Structure RMN de MA du VIH-1 liant le phosphatidylinositol-4.5-bisphosphate [PI(4.5)P2] sur la membrane. (Saad, Miller et al., 2006). Les résidus basique de MA (bleu) interagissent électrostatiquement avec des groupes phosphate (rouge) du PI (4,5) P2 (jaune et rouge). La liaison PI (4,5) P2 à MA induit l'exposition du groupe myristyle (vert), qui lui permet de s'insérer dans la membrane. On observe que la chaîne acyle non saturée 2 (jaune) du PI (4,5) P2 liée sur une poche hydrophobe de MA.

### Thérapies ciblant CA

Les informations structurales détaillées du domaine CA sont actuellement disponibles, générées par les différentes méthodes de cristallographie de diffraction aux rayons X, de RMN et de cryotomographie, soutenue par des analyses de mutagenèse. Ce qui a permis de diversifier les cibles potentielles au développement d'inhibiteurs. Ainsi il a été montré que des inhibiteurs capables de se lier à CA pourraient potentiellement perturber l'assemblage des particules virales immatures.

Des études *in-vitro* ont montrées que des peptides CTAs isolés ont servi comme inhibiteurs compétitifs de l'assemblage de CA. Des petits peptides ou molécules organiques capables de s'attacher sur l'interface de dimérisation du CTD sont capables de réduire la dimérisation de CA. Une étude effectuée par Hilpert et al. utilisant le peptide IPVGEIYKRW correspondant a helice- $\alpha$  7

du NTD de CA; montre une capacité d'inhibition de la démerisation de CA, mais le mécanisme responsable de cette inhibition reste non-déterminé (Garzon, Lidon-Moya et al., 2004).

L'approche *in silico* à permis d'identifier une petite molécule organique N-(3-chloromethylphenyl)-N'-[2-[(5-[(diméthylamino)-méthyl]2-furyl)-méthyl]-sulfany]ethyl carbamide (CAP-1) capable de lier le NTD CA. Cette interaction perturbe les processus de maturation et d'assemblage du virus dans des systèmes cellulaires (Tang, Loeliger et al., 2003). Les études de structure par RMN et cristallographique aux rayons X ont montrés que le site de liaison de CAP-1 est située sur une poche formée à l'endroit où interagissent les hélices 1,2,4 et 7 de NTD comme illustré sur la Figure-13, la liaison de CAP-1 au NTD induit le déplacement du noyau aromatique enfoui de Phe-32 en créant le site de liaison au CAP-1. Ainsi l'interaction du CAP-1 avec la CTD est en grande partie hydrophobe et semble perturber l'amarrage de NTD et CTD. Bien que CAP-1 affiche relativement une faible affinité à la CA et une cytotoxicité significative, la poche Phe-32 servira probablement comme une cible intéressante pour le développement de futur médicament anti-CA (Kelly, Kyere et al., 2007).

D'autres études ont pu identifier un autre peptide ITFEDLLDYYGP appelé CAI (CA inhibiteurs d'assemblage) capable de lier le CTD CA. Cette séquence de CAI n'est pas homologue au domaine de dimérisation du CTD mais inhibe l'assemblage *in vitro* de deux particules sphériques qui sont analogues aux VLPs immatures. La liaison de CAI à CA perturbe l'interface de dimérisation de CA et interfère entre les contacts de CTD et NTD. Ainsi la liaison de CAI à CA est potentiellement déstabilisante de la base du virus (Barklis, Alfadhli et al., 2009).

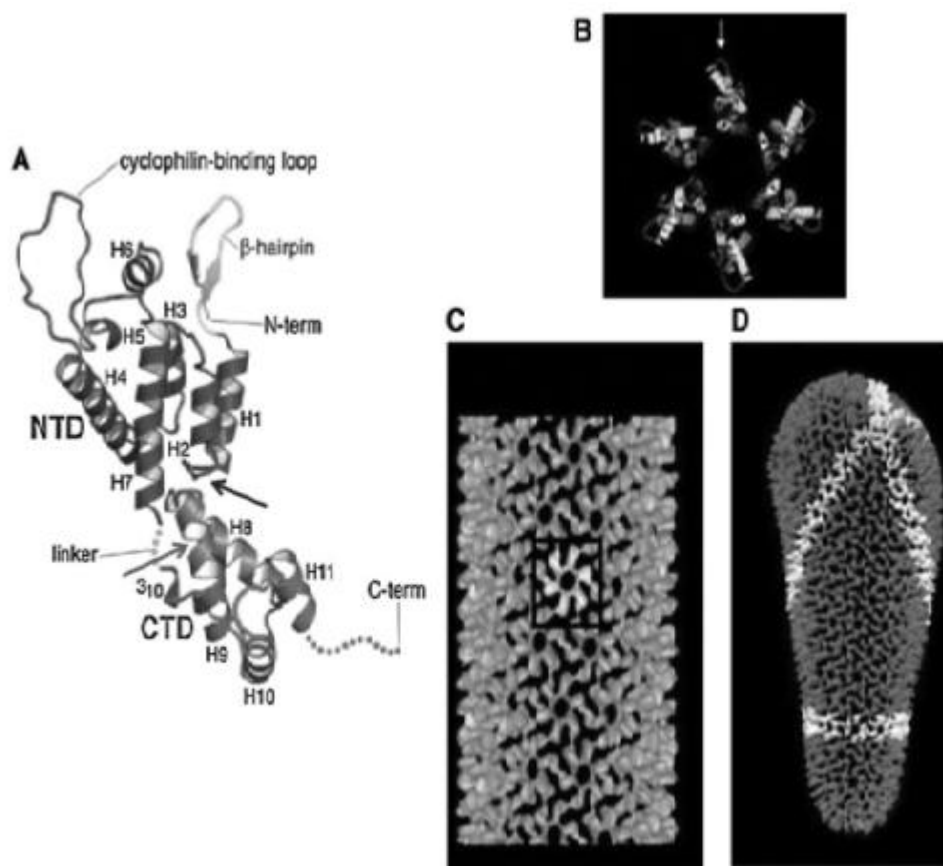
CAI lui-même n'affiche pas une activité antivirale, par ce qu'il est imperméable pour les cellules. Cette limitation, cependant, a été surmontée en utilisant des molécules de synthèses cycliques pour générer des dérivés capables de traverser la membrane plasmique. Les peptides qui en résulte, le NYAD-1 et son dérivé hydrosoluble NYAD-13. Ces 2 peptides pénètrent dans les cellules et perturbent l'assemblage des VLPs immatures, inhibe la maturation des virus et présentaient un effet antiviral efficace. Les études de structures indiquent que CAI et NYAD-1 se lient sur la même poche hydrophobe de CTD (Bhattacharya, Zhang et al., 2008).

Comme indiqué précédemment, une boucle riche en proline dans le CA NTD, lie la peptidyl-prolyl isomérase: cyclophiline-A. Des essais primaires ont démontré que la perturbation de l'interaction de CA-cyclophiline-A avec la cyclosporine inhibent la répllication de VIH-1. Plus récemment, un analogue de la cyclosporine, Debio-025, a été montré capable d'empêcher

efficacement la réplication du VIH-1 et présentant une cytotoxicité réduite par rapport à la cyclosporine (Daelemans, Dumont et al., 2010).

Dans un criblage à haut débit des composés inhibant la réplication du VIH-1, Des chercheurs de Pfizer ont identifié un composé PF-1385801, qui cible le CA NTD. Blain et al préparé plusieurs analogues de ce composé, deux d'entre eux, le PF-3450074 et le PF-3559857 ont montré une activité intéressante contre la plupart des isolats du VIH-1 et à des concentrations inférieures à 1µM. Ces composés inhibent les stades précoces et tardifs de la réplication du VIH-1. Une structure cristalline de CA et PF-3450074 révèle que ce composé se lie sur la poche formée par les hélices 3,4,5,et 7 de CA NTD (Blair, Pickford et al., 2010).

L'ensemble des études indiquent que la protéine CA du VIH-1 constitue une cible potentielle de développement de nouveau médicaments anti-VIH-1.



**Figure-13:** Structure de la CA mature du VIH-1(Waheed & Freed, 2012) (A) Structure tertiaire de monomère mature CA avec le NTD et CTD connectés par la région de liaison. Les hélices 1-11 (H1-11), la boucle de liaison à la cyclophiline A sont indiquées. Les résidus C-terminal de CA qui sont généralement désordonnés dans la structure cristalline sont indiqués en pointillés. Les sites de liaison pour CAI / NYAD-1 / NYAD-13 et CAP1 sont indiqués par des flèches grise et noir, respectivement. (B) Modèle moléculaire du cycle hexamérique formé par le NTD de CA, avec la boucle de liaison à la cyclophiline A indiquée par une flèche.

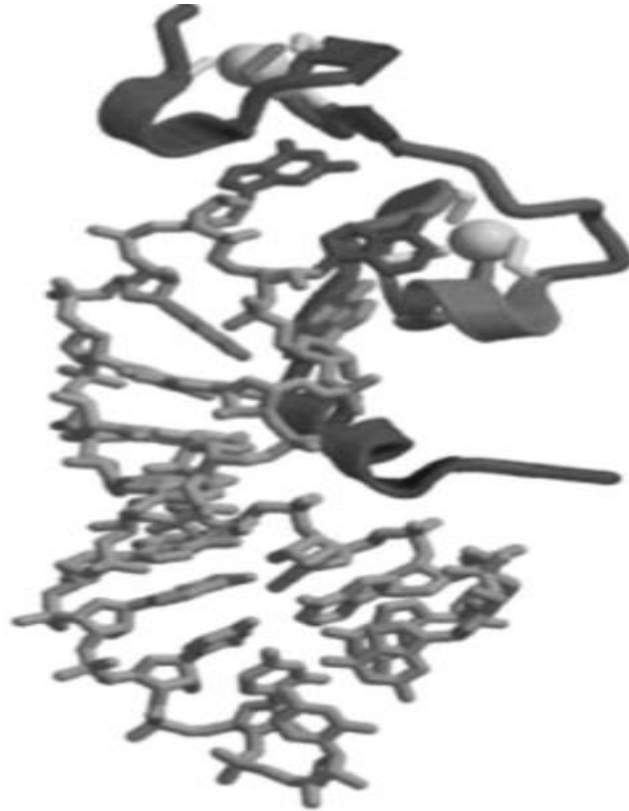
(C) Vue externe de la structure assemblée, montrant un hexamère (blanc) et le réseau CA hexagonal (gris). Barre d'échelle = 10nm. (D) Modèle d'un noyau conique du VIH-1. Une ligne continue d'hexamères est mise en surbrillance en blanc.

### Thérapies ciblant NC

Les rôles critiques de la NC dans la réplication du VIH-1, ainsi que le fort degré de conservation des motifs de doigts de zinc de NC, suggèrent que la NC peut être une bonne cible pour le développement de médicaments anti-VIH-1. Au cours des deux dernières décennies, un certain nombre d'inhibiteurs de la NC du VIH-1 ont été décrits, la plupart d'entre eux agissent en déstabilisant les doigts de zinc. Rice et ses collègues ont rapporté que ces inhibiteurs oxydent les cystéines composant les doigts de zinc de NC, détruisant ainsi la structure en doigt de zinc qui inactive l'infectiosité du virus (Rice, Supko et al., 1995).

Un exemple de ces inhibiteurs est le 2, 2-dipyridyle disulfure (également connu sous le nom aldrithiol-2 ou AT-2), il induit une réticulation au sein de la NC et pr55<sup>Gag</sup> et est fréquemment utilisé comme un outil de recherche par inactivation chimique du VIH-1. L'agent alkylant N-éthylmaléimide (NEM), attaque les groupements thiols de zinc de la NC et par conséquent entrave l'infectiosité du virus. Appella et ses collègues rapportent que pyridinioalkanoyl thioesters (PATEs) cible sélectivement les doigts de zinc de NC sans affecter les doigts de zinc retrouvés sur d'autres protéines virales ou cellulaires (Song, Goel et al., 2002).

Les composés décrits ci-dessus agissent principalement en attaquant les ions zinc liées aux doigts de zinc de NC Figure-14. L'activité chaperonne des acides nucléiques de NC pourrait également être prise pour cible. Dans cet objectif, Rocquigny et ses collègues ont mis au point des molécules qui inhibent l'interaction de NC avec l'acide nucléique. Cinq composés avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'ordre de micromolaire ont été identifiés qui se lient aux doigts de zinc de NC et empêchent ainsi cette protéine d'interagir avec la structure tige-boucle de l'ARN. Ces molécules bloquent la liaison NC à l'ARN sans favoriser l'éjection du zinc (Shvadchak, Sanglier et al., 2009). Une approche alternative est de déstabiliser la fonction de NC dans l'encapsulation des ARNs. Ces progrès réalisés dans le développement inhibiteurs de NC de plus en plus puissants suggèrent que cet aspect reste prometteur dans les recherches à venir (Turner, Hagan et al., 2006).



**Figure 14:** Structure de NC liée à la tige boucle de SL3 de la séquence signal d'encapsidation de l'ARN du VIH-1(Turner & Summers, 1999). Les billes grises représentent les deux ions de zinc liés aux motifs de doigt de zinc

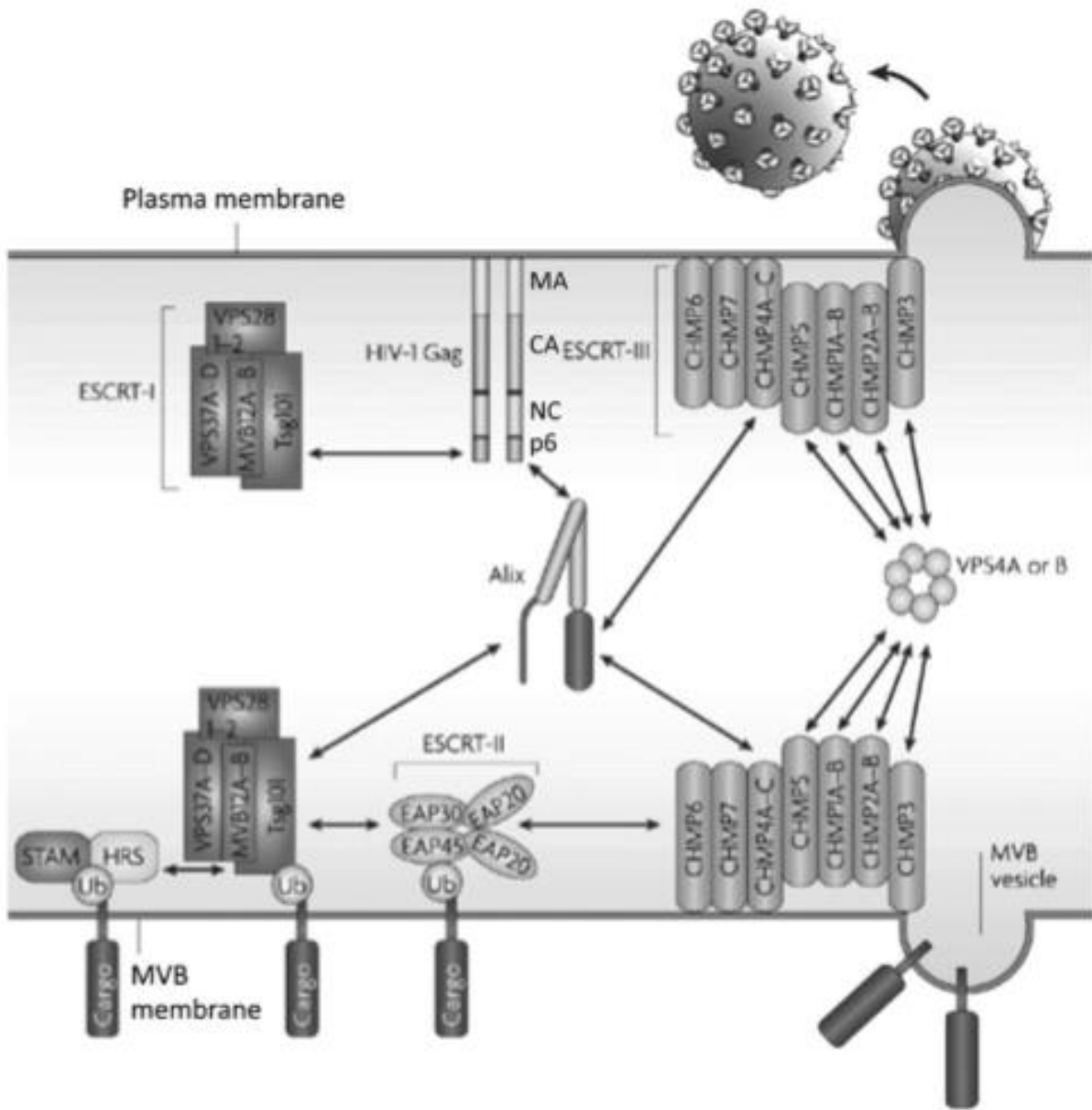
### **Thérapies ciblant P6**

Les interactions de Gag avec la machinerie de tri endosomal constituent des cibles intéressantes pour le développement d'inhibiteurs antiviraux. Les données structurales issues des études cristallographiques aux rayons X et de RMN ont fourni des détails des structures des interactions du motif TP/SAP et YP(X)L avec Tsg101 et Alix respectivement. Ces interactions sont relativement de faible affinité, cohérente avec les autres interactions protéine-protéine, le long de la voie ESCRT Figure-15. Dans le but de concevoir des inhibiteurs compétitifs à l'interaction de PT/SAP-Tsg101 qui affichent une affinité accrue pour Tsg101. Burke et ses collègues ont remplacé les résidus Pro du peptide PEPTAPPEE avec des glycines pour générer un grand nombre de ces dérivés peptoid. Dans une étude de screening, chacun des acides aminés du peptide PEPTAPPEE a été remplacé par amino-oxy-contenant des résidus. Des mesures d'Anisotropie de fluorescence ont été utilisées pour évaluer l'affinité de liaison de chaque peptoid avec le domaine UEV de Tsg101 (Liu, Stephen et al., 2008). Dans certains cas, des augmentations de 15 à 20 fois en affinité ont été observées par rapport au peptide parental PEPTAPPEE. Enfin, la conformation de la liaison apparaît stabilisée et l'absorption

cellulaire est améliorée. Des efforts sont en cours pour tester ces peptoid et leur capacité à inhiber le bourgeonnement du VIH-1 (Liu, Stephen et al., 2006).

Dans une autre étude indépendante, Tavassoli et ses collègues ont conçu un système double-hybride pour identifier les inhibiteurs de l'interaction de P6-Tsg-101. Ils ont généré une grande bibliothèque ( $10^8$ ) de peptides cycliques et tester les peptides qui interférait avec l'interaction de P6 avec Tsg101. Après plusieurs séries d'analyses, quatre peptides cycliques ont été identifiés capable d'inhiber ces interactions, et un de ces peptides (IYWNVSGW) a montré une capacité modeste d'inhiber la libération de particules virales en culture cellulaire. L'activité inhibitrice du peptide s'avère PT/SAP-dépendante (Tavassoli, Lu et al., 2008).

Jusqu'ici, les efforts sont portés sur l'interface PT/SAP-Tsg101, comme il s'agit de l'interaction du late domain principal requis pour bourgeonnement du VIH-1. Également le blocage de l'interaction P6-Alix peut être testé pour voir si cela peut perturber la libération du VIH-1. Le ciblage des interactions de Gag avec la machinerie ESCRT et bloquer les interactions virales avec les autres protéines cellulaires constituent des cibles intéressantes afin d'arriver à inhiber l'étape du bourgeonnement des virus.



**Figure 15:** Représentation schématique de la machinerie ESCRT et son interaction avec Gag du VIH-1 sur la membrane plasmique. (Fujii et al., 2007). Les domaines MA, CA, NC et p6 de Gag sont affichés. Les flèches doubles désignent l'interaction de p6 avec Tsg101 et Alix, Alix avec Tsg101 et Vps4 avec ESCRT-III.

## Conclusion générale

Le VIH-1 constitue l'une des menaces les plus graves pour la santé humaine dans le monde. En l'absence d'un vaccin protecteur, il est susceptible de rester un agent pathogène humain majeur dans un avenir prévisible. Les progrès réalisés dans le traitement de l'infection par le VIH-1 représentent un succès majeur de la recherche biomédicale moderne, prolongeant ainsi la vie des malades et réduisant la transmission du virus. Les patients infectés recevant un traitement peuvent maintenant s'attendre à vivre plusieurs décennies plus longtemps que ce serait sans thérapie. Ce succès n'a toutefois pas été complet. Bien que gérable, l'infection par le VIH-1 reste généralement incurable et les médicaments utilisés pour le contrôler sont nécessaires. Il reste cependant de nombreux défis liés principalement aux effets secondaires de la tri-thérapie à long terme et au danger toujours présent de l'émergence de souches pharmaco-résistantes. Pour contrer ces menaces, il existe un besoin continu de nouvelles et meilleures drogues, idéalement ciblant de multiples étapes indépendantes du cycle de réplication du VIH-1. Les médicaments actuels les plus réussis visent les enzymes virales: la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN).

Au cours des dernières années, le VIH-1 a connu une explosion de nouvelles connaissances des rôles de la protéine Gag durant les étapes d'assemblage, la libération et la maturation du VIH-1. De nouvelles informations ont également été acquises sur la fonction des protéines Gag, en particulier les domaines CA et NC, pendant le début du cycle de réplication. Outre, les progrès de la biologie structurale ont considérablement contribué à notre connaissance des interactions Gag-Gag et les développements de la biologie cellulaire ont révélé les détails moléculaires des voies cellulaires de l'hôte utilisées par le virus pour promouvoir sa réplication ainsi que les facteurs de restriction cellulaire qui entravent l'infection du virus. Malgré ces progrès impressionnants, à ce jour, les protéines Gag n'ont pas encore été exploitées avec succès dans le développement de traitements antirétroviraux cliniquement approuvés. Bien que les médicaments anti-VIH-1 actuels soient très efficaces chez la plupart des patients, il est probable que l'apparition des résistances à ces inhibiteurs deviendra un problème croissant dans le futur. Nous croyons donc que l'attention devrait commencer à s'allonger à partir des études fondamentales en relation avec les fonctions de Gag vers des applications thérapeutiques ciblant cette protéine.

L'évolution de la résistance aux médicaments par le VIH-1 continue d'être un défi permanent. Dans ce contexte, il est clair que l'amélioration des médicaments avec de nouvelles cibles est essentielle pour maintenir l'efficacité de l'HAART (Highly active antiretroviral therapy) à long

terme. En tant que protéine principalement responsable de la conduite de l'assemblage du VIH-1, Gag est une cible attrayante pour de tels efforts et les composés et stratégies décrits ci-dessus exploitent une gamme de cibles distinctes dans la protéine Gag, agissant tôt ou tard lors du cycle de réplication. Les composés qui inhibent la maturation en bloquant le clivage de CA-SP1 ou en se liant sur CA montrent des propriétés encourageantes en perturbant efficacement la réplication du VIH-1 à des concentrations raisonnablement faibles. Bien qu'il reste encore beaucoup de travail pour produire des composés appropriés utilisables chez l'homme, ces études démontrent la valeur potentielle des composés ciblant Gag et suggèrent qu'à l'avenir, ces inhibiteurs puissent se joindre à l'arsenal de médicaments disponibles pour lutter contre la pandémie SIDA. En plus des bénéfices cliniques pour les patients infectés par le VIH-1, les efforts de découverte de nouveaux médicaments continueront de fournir des idées nouvelles et fondamentales sur les mécanismes moléculaires régissant les étapes d'assemblage du VIH-1.

## Références bibliographiques:

- Adamson CS, Freed EO (2007) Human immunodeficiency virus type 1 assembly, release, and maturation. *Advances in pharmacology* 55: 347-87
- Alfadhli A, Still A, Barklis E (2009) Analysis of human immunodeficiency virus type 1 matrix binding to membranes and nucleic acids. *Journal of virology* 83: 12196-203
- Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI, Montefiori DC, Xu Y, Herndon JG, Wyatt LS, Candido MA, Kozyr NL, Earl PL, Smith JM, Ma HL, Grimm BD, Hulsey ML, Miller J, McClure HM, McNicholl JM et al. (2001) Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292: 69-74
- Balasubramaniam M, Freed EO (2011) New insights into HIV assembly and trafficking. *Physiology* 26: 236-51
- Barklis E, Alfadhli A, McQuaw C, Yalamuri S, Still A, Barklis RL, Kukull B, Lopez CS (2009) Characterization of the in vitro HIV-1 capsid assembly pathway. *Journal of molecular biology* 387: 376-89
- Beaudeau JL (2011) HIV, 30 years after. 640
- Bhattacharya S, Zhang H, Debnath AK, Cowburn D (2008) Solution structure of a hydrocarbon stapled peptide inhibitor in complex with monomeric C-terminal domain of HIV-1 capsid. *The Journal of biological chemistry* 283: 16274-8
- Blair WS, Pickford C, Irving SL, Brown DG, Anderson M, Bazin R, Cao J, Ciaramella G, Isaacson J, Jackson L, Hunt R, Kjerrstrom A, Nieman JA, Patick AK, Perros M, Scott AD, Whitby K, Wu H, Butler SL (2010) HIV capsid is a tractable target for small molecule therapeutic intervention. *PLoS pathogens* 6: e1001220
- Braaten D, Franke EK, Luban J (1996) Cyclophilin A is required for an early step in the life cycle of human immunodeficiency virus type 1 before the initiation of reverse transcription. *Journal of virology* 70: 3551-60
- Briggs JA, Riches JD, Glass B, Bartonova V, Zanetti G, Krausslich HG (2009) Structure and assembly of immature HIV. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 11090-5
- Bryant M, Ratner L (1990) Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 523-7
- Bukrinskaya AG (2004) HIV-1 assembly and maturation. *Archives of virology* 149: 1067-82
- Campochiaro PA (2006) Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. *Gene therapy* 13: 559-62
- Carlton JG, Martin-Serrano J (2007) Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316: 1908-12
- Cartier C, Sivard P, Tranchat C, Decimo D, Desgranges C, Boyer V (1999) Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *The Journal of biological chemistry* 274: 19434-40
- Cazeaux N, Bennasser Y, Vidal PL, Li Z, Paulin D, Bahraoui E (2002) Comparative study of immune responses induced after immunization with plasmids encoding the HIV-1 Nef protein under the control of the CMV-IE or the muscle-specific desmin promoter. *Vaccine* 20: 3322-31
- Chaix F, Goujard C (2009) [Antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infection: an update]. *La Revue de medecine interne* 30: 543-54
- Chukkapalli V, Hogue IB, Boyko V, Hu WS, Ono A (2008) Interaction between the human immunodeficiency virus type 1 Gag matrix domain and phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate is essential for efficient gag membrane binding. *Journal of virology* 82: 2405-17

Chukkapalli V, Oh SJ, Ono A (2010) Opposing mechanisms involving RNA and lipids regulate HIV-1 Gag membrane binding through the highly basic region of the matrix domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 1600-5

Cullen BR (2003) Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends in biochemical sciences* 28: 419-24

Daelemans D, Dumont JM, Rosenwirth B, De Clercq E, Pannecouque C (2010) Debio-025 inhibits HIV-1 by interfering with an early event in the replication cycle. *Antiviral research* 85: 418-21

Dahl V, Josefsson L, Palmer S (2010) HIV reservoirs, latency, and reactivation: prospects for eradication. *Antiviral research* 85: 286-94

De Corte BL (2005) From 4,5,6,7-tetrahydro-5-methylimidazo[4,5,1-jk](1,4)benzodiazepin-2(1H)-one (TIBO) to etravirine (TMC125): fifteen years of research on non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of medicinal chemistry* 48: 1689-96

Demirov DG, Freed EO (2004) Retrovirus budding. *Virus research* 106: 87-102

Demirov DG, Ono A, Orenstein JM, Freed EO (2002a) Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 955-60

Demirov DG, Orenstein JM, Freed EO (2002b) The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell type-dependent manner. *Journal of virology* 76: 105-17

Drupal (2017) Trithérapie antiretrovirale.

Egan MA, Carruth LM, Rowell JF, Yu X, Siliciano RF (1996) Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *Journal of virology* 70: 6547-56

Ehrlich LS, Medina GN, Khan MB, Powell MD, Mikoshiba K, Carter CA (2010) Activation of the inositol (1,4,5)-triphosphate calcium gate receptor is required for HIV-1 Gag release. *Journal of virology* 84: 6438-51

Engelman A, Cherepanov P (2012) The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature reviews Microbiology* 10: 279-90

Fassati A, Goff SP (2001) Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 75: 3626-35

Felber BK, Pavlakis GN (1993) Molecular biology of HIV-1: positive and negative regulatory elements important for virus expression. *Aids* 7 Suppl 1: S51-62

Fenouillet E, Clerget-Raslain B, Gluckman JC, Guetard D, Montagnier L, Bahraoui E (1989) Role of N-linked glycans in the interaction between the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus and its CD4 cellular receptor. Structural enzymatic analysis. *The Journal of experimental medicine* 169: 807-22

Fernandes F, Chen K, Ehrlich LS, Jin J, Chen MH, Medina GN, Symons M, Montelaro R, Donaldson J, Tjandra N, Carter CA (2011) Phosphoinositides direct equine infectious anemia virus gag trafficking and release. *Traffic* 12: 438-51

Freed EO (2001) HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics* 26: 13-33

Freed EO (2015) HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature reviews Microbiology* 13: 484-96

Freed EO, Martin MA (1995) Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *Journal of virology* 69: 1984-9

Fujii K, Hurley JH, Freed EO (2007) Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1. *Nature reviews Microbiology* 5: 912-6

Gallo V (2012) Myristoylation.

Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI (2008) The structural biology of HIV assembly. *Current opinion in structural biology* 18: 203-17

Garzon MT, Lidon-Moya MC, Barrera FN, Prieto A, Gomez J, Mateu MG, Neira JL (2004) The dimerization domain of the HIV-1 capsid protein binds a capsid protein-derived peptide: a biophysical characterization. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13: 1512-23

Greene WC (1991) The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *The New England journal of medicine* 324: 308-17

Grinsztejn B, Nguyen BY, Katlama C, Gatell JM, Lazzarin A, Vittecoq D, Gonzalez CJ, Chen J, Harvey CM, Isaacs RD, Protocol T (2007) Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. *Lancet* 369: 1261-9

Guatelli JC (2009) Interactions of viral protein U (Vpu) with cellular factors. *Current topics in microbiology and immunology* 339: 27-45

Henriet S, Mercenne G, Bernacchi S, Paillart JC, Marquet R (2009) Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 73: 211-32

Herbein G, Gras G, Khan KA, Abbas W (2010) Macrophage signaling in HIV-1 infection. *Retrovirology* 7: 34

Hidreau P (2006) The HIV/AIDS epidemic and its situation in a developing country:benin. 97

Hostetler KY, Richman DD, Forssen EA, Selk L, Basava R, Gardner MF, Parker S, Basava C (1994) Phospholipid prodrug inhibitors of the HIV protease. Antiviral activity and pharmacokinetics in rats. *Biochemical pharmacology* 48: 1399-404

Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO (1995) p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *Journal of virology* 69: 6810-8

Jolly C, Mitar I, Sattentau QJ (2007) Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology* 81: 5547-60

Joshi A, Ablan SD, Soheilian F, Nagashima K, Freed EO (2009a) Evidence that productive human immunodeficiency virus type 1 assembly can occur in an intracellular compartment. *Journal of virology* 83: 5375-87

Joshi A, Garg H, Nagashima K, Bonifacino JS, Freed EO (2008) GGA and Arf proteins modulate retrovirus assembly and release. *Molecular cell* 30: 227-38

Joshi A, Nagashima K, Freed EO (2009b) Defects in cellular sorting and retroviral assembly induced by GGA overexpression. *BMC cell biology* 10: 72

Kahn RA (2009) Toward a model for Arf GTPases as regulators of traffic at the Golgi. *FEBS letters* 583: 3872-9

Kelly BN, Kyere S, Kinde I, Tang C, Howard BR, Robinson H, Sundquist WI, Summers MF, Hill CP (2007) Structure of the antiviral assembly inhibitor CAP-1 complex with the HIV-1 CA protein. *Journal of molecular biology* 373: 355-66

Kernbaum S (1996) Le praticien face au SIDA 359

Kiernan RE, Ono A, Englund G, Freed EO (1998) Role of matrix in an early postentry step in the human immunodeficiency virus type 1 life cycle. *Journal of virology* 72: 4116-26

Larder BA, Darby G, Richman DD (1989) HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* 243: 1731-4

Larrouy L, Chazallon C, Landman R, Capitant C, Peytavin G, Collin G, Charpentier C, Storto A, Pialoux G, Katlama C, Girard PM, Yeni P, Aboulker JP, Brun-Vezinet F, Descamps D, Group AS (2010) Gag mutations can impact virological response to dual-boosted protease inhibitor combinations in antiretroviral-naive HIV-infected patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54: 2910-9

Lehmann M, Milev MP, Abrahamyan L, Yao XJ, Pante N, Mouland AJ (2009) Intracellular transport of human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA and viral production are dependent on dynein motor function and late endosome positioning. *The Journal of biological chemistry* 284: 14572-85

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. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 80: 217-86

Liu F, Stephen AG, Adamson CS, Gousset K, Aman MJ, Freed EO, Fisher RJ, Burke TR, Jr. (2006) Hydrazone- and hydrazide-containing N-substituted glycines as peptoid surrogates for expedited library synthesis: application to the preparation of Tsg101-directed HIV-1 budding antagonists. *Organic letters* 8: 5165-8

Liu F, Stephen AG, Waheed AA, Aman MJ, Freed EO, Fisher RJ, Burke TR, Jr. (2008) SAR by oxime-containing peptide libraries: application to Tsg101 ligand optimization. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 9: 2000-4

lortholary O (2000): 234

Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR (1989) The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338: 254-7

Martin-Serrano J, Yarovoy A, Perez-Caballero D, Bieniasz PD (2003) Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 12414-9

Martinez NW, Xue X, Berro RG, Kreitzer G, Resh MD (2008) Kinesin KIF4 regulates intracellular trafficking and stability of the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *Journal of virology* 82: 9937-50

McLaughlin S, Murray D (2005) Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 438: 605-11

Moynier M, Kavsan V, Gales C, Montagnier L, Bahraoui E (1998) Characterization of humoral immune responses induced by immunization with plasmid DNA expressing HIV-1 Nef accessory protein. *Vaccine* 16: 1523-30

Naghavi MH, Goff SP (2007) Retroviral proteins that interact with the host cell cytoskeleton. *Current opinion in immunology* 19: 402-7

Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451: 425-30

Ohagen A, Gabuzda D (2000) Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *Journal of virology* 74: 11055-66

Ohno H (2006) Clathrin-associated adaptor protein complexes. *Journal of cell science* 119: 3719-21

Ono A, Ablan SD, Lockett SJ, Nagashima K, Freed EO (2004) Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14889-94

ouiza L (2005) The point about the anti HIV vaccine. 111

Piller SC, Caly L, Jans DA (2003) Nuclear import of the pre-integration complex (PIC): the Achilles heel of HIV? *Current drug targets* 4: 409-29

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-59

Rai T, Mosoian A, Resh MD (2010) Annexin 2 is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle production but plays a cell type-dependent role in regulating infectivity. *Journal of virology* 84: 9783-92

Rice WG, Supko JG, Malspeis L, Buckheit RW, Jr., Clanton D, Bu M, Graham L, Schaeffer CA, Turpin JA, Domagala J, Gogliotti R, Bader JP, Halliday SM, Coren L, Sowder RC, 2nd, Arthur LO,

Henderson LE (1995) Inhibitors of HIV nucleocapsid protein zinc fingers as candidates for the treatment of AIDS. *Science* 270: 1194-7

Ruiz A, Hill MS, Schmitt K, Stephens EB (2010) Membrane raft association of the Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 correlates with enhanced virus release. *Virology* 408: 89-102

Rusten TE, Stenmark H (2009) How do ESCRT proteins control autophagy? *Journal of cell science* 122: 2179-83

Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF (2006) Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 11364-9

Salemi M, Lamers SL, Yu S, de Oliveira T, Fitch WM, McGrath MS (2005) Phylodynamic analysis of human immunodeficiency virus type 1 in distinct brain compartments provides a model for the neuropathogenesis of AIDS. *Journal of virology* 79: 11343-52

Shkriabai N, Datta SA, Zhao Z, Hess S, Rein A, Kvaratskhelia M (2006) Interactions of HIV-1 Gag with assembly cofactors. *Biochemistry* 45: 4077-83

Shvadchak V, Sanglier S, Rocle S, Villa P, Haiech J, Hibert M, Van Dorsselaer A, Mely Y, de Rocquigny H (2009) Identification by high throughput screening of small compounds inhibiting the nucleic acid destabilization activity of the HIV-1 nucleocapsid protein. *Biochimie* 91: 916-23

Song Y, Goel A, Basrur V, Roberts PE, Mikovits JA, Inman JK, Turpin JA, Rice WG, Appella E (2002) Synthesis and biological properties of amino acid amide ligand-based pyridinioalkanoyl thioesters as anti-HIV agents. *Bioorganic & medicinal chemistry* 10: 1263-73

Tang C, Loeliger E, Kinde I, Kyere S, Mayo K, Barklis E, Sun Y, Huang M, Summers MF (2003) Antiviral inhibition of the HIV-1 capsid protein. *Journal of molecular biology* 327: 1013-20

Tani S (2012) Caractérisation moléculaire du VIH et du papillomavirus humain chez les femmes en âge de procréer infectées et diagnostic précoce par PCR du VIH chez leurs enfants au centre médical Saint Camille et au CERBA – Ouagadougou 144

Tavassoli A, Lu Q, Gam J, Pan H, Benkovic SJ, Cohen SN (2008) Inhibition of HIV budding by a genetically selected cyclic peptide targeting the Gag-TSG101 interaction. *ACS chemical biology* 3: 757-64

Tremblay J-FFRCMJ (2001) Présence des protéines de la cellule hôte sur les particules virales : influence sur le cycle de vie du VIH-1.

Tremblay MJ, Fortin JF, Cantin R (1998) The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunology today* 19: 346-51

Turner BG, Summers MF (1999) Structural biology of HIV. *Journal of molecular biology* 285: 1-32

Turner KB, Hagan NA, Fabris D (2006) Inhibitory effects of archetypical nucleic acid ligands on the interactions of HIV-1 nucleocapsid protein with elements of Psi-RNA. *Nucleic acids research* 34: 1305-16

Usami Y, Popov S, Popova E, Inoue M, Weissenhorn W, H GG (2009) The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochemical Society transactions* 37: 181-4

van't Wout AB, Kootstra NA, Mulder-Kampinga GA, Albrecht-van Lent N, Scherpbier HJ, Veenstra J, Boer K, Coutinho RA, Miedema F, Schuitemaker H (1994) Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *The Journal of clinical investigation* 94: 2060-7

Vasilescu A, Heath SC, Ivanova R, Hendel H, Do H, Mazoyer A, Khadivpour E, Goutalier FX, Khalili K, Rappaport J, Lathrop GM, Matsuda F, Zagury JF (2003) Genomic analysis of Th1-Th2 cytokine genes in an AIDS cohort: identification of IL4 and IL10 haplotypes associated with the disease progression. *Genes and immunity* 4: 441-9

Vidricaire G (2006) Study of the stages early cycle of replication of the human immunodeficiency virus of type 1 in trophoblastic cells. 408

Waheed AA, Freed EO (2010) The Role of Lipids in Retrovirus Replication. *Viruses* 2: 1146-1180

- Waheed AA, Freed EO (2012) HIV type 1 Gag as a target for antiviral therapy. *AIDS research and human retroviruses* 28: 54-75
- Weber SS, Ragaz C, Hilbi H (2009) Pathogen trafficking pathways and host phosphoinositide metabolism. *Molecular microbiology* 71: 1341-52
- Wenk MR, De Camilli P (2004) Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 8262-9
- Wollert T, Hurley JH (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464: 864-9
- Yarchoan R, Klecker RW, Weinhold KJ, Markham PD, Lyerly HK, Durack DT, Gelmann E, Lehrman SN, Blum RM, Barry DW, et al. (1986) Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* 1: 575-80
- Zhou W, Resh MD (1996) Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *Journal of virology* 70: 8540-8
- Zimmerman C, Klein KC, Kiser PK, Singh AR, Firestein BL, Riba SC, Lingappa JR (2002) Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature* 415: 88-92